

# **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

## **FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

Departamento de Estomatología III (Medicina y Cirugía Bucofacial)



## **TESIS DOCTORAL**

Expresión de antígenos sanguíneos y proteínas de choque térmico en el carcinoma oral de células escamosas, lesiones potencialmente malignas y mucosa control

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Virginia García García

Directores

Antonio Bascones Martínez  
Emilia Álvarez Fernández

**Madrid, 2012**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA III**

**“Expresión de antígenos sanguíneos y proteínas de choque térmico en el Carcinoma Oral de Células Escamosas, lesiones potencialmente malignas y mucosa control”**



**TESIS DOCTORAL**

**Virginia García García**

Director de tesis: **Don Antonio Bascones Martínez**

Co-director de tesis: **Don Emilio Álvarez Fernández**

**Madrid, 2012**

*\* Mención de doctorado europeo*

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría, en primer lugar, y porque se lo merecen, agradecer a mis directores de tesis que han sabido guiarme durante estos ocho años de trabajo por el arduo sendero de la investigación. El profesor Antonio Bascones, maestro con un lema claro, “el que la sigue la consigue”, ha sido un gran apoyo, un ejemplo profesional y de vida a seguir y una fuente de motivación constante. El profesor Emilio Álvarez, maestro al que admiro por su plena dedicación a la oncología y su sabiduría en este campo, ha sido capaz de hacer crecer en mí la necesidad por ahondar más en el mismo. Gracias a los dos por la gran implicación mostrada en este proyecto.

Con un profundo sentimiento, agradezco al equipo de profesores de Ginebra, la Dra. Carla Patricia Martinelli-Klay y los Dres. Tommaso Lombardi y Roger Küffer, la gran ayuda prestada en la parte europea de esta tesis, así como la motivación tan positiva para continuar investigando en el campo de la Medicina Oral. También agradezco a mi compañera de aventuras Ana I. García Kass por habernos motivado mutuamente y haber sido capaces de organizarnos para llevar a cabo la estancia europea.

Un agradecimiento especial al personal de laboratorio por su dedicación y trabajo. A Judi de la Universidad de Granada por iniciarme en las técnicas de inmunohistoquímica durante la realización del trabajo para la obtención del Diploma de Estudios Avanzados, a la Dra. Maria Luisa Herranz y Rocío del H.G.U. Gregorio Marañón y a los técnicos del Laboratorio de Histopatología en Ginebra, por llevar a cabo el procesamiento de las muestras. Asimismo agradecer al Dr. Santiago Cano por su participación en el análisis estadístico de este trabajo.

Un agradecimiento generalizado para todos mis profesores, alumnos, compañeros y pacientes que me han permitido y me permiten crecer en el día a día.

El agradecimiento más especial es a mi familia. A mis hermanas Micaela y Montserrat, por ser un ejemplo para mí desde pequeña, por estar siempre ahí, por apoyarme y por quererme tanto. A la Yaya por acogerme como a una nieta. A Rosa, Eduardo, Yaiza, Laura y Don Jesús, por el cariño que me dais en el día a día y por los buenos momentos vividos juntos. A mis cuñados y a mis sobrinas Carla y Olivia, deseando que las nuevas generaciones y las que están por venir, tengan una mayor capacidad y medios para luchar contra esta terrible enfermedad.

*A mis padres Joaquín y M<sup>a</sup> Teresa,  
todo un ejemplo de lucha, tesón y superación.  
Os adoro y os necesito en el día a día.*



*A Borja, mi alma gemela.*  
*Porque una y mil veces te volvería a elegir,*  
*por ser el motor de mi vida ,*  
*por luchar juntos y disfrutar en el día a día,*  
*por ser los dos “uno”.*

## RESUMEN EN INGLÉS:

Classical dysplasia classification is subjective and has very important limitations. With this doctoral thesis we try to demonstrate the usefulness of some molecular biomarkers that could improve the obtained information from the routine histopathological analysis in order to detect the risk of malignant transformation. This thesis is divided in two different parts:

**First Part:** This part has been carried out at the Faculty of Medicine in Geneva and will be presented with two papers to opt for the mention of European doctoral thesis. On the first paper the more important aspects regarding Oral Lichen Planus natural dynamic evolution are reviewed and the different stages of activity are presented. On the second paper the aim was to analyse the expression of *hsp27* in 36 specimens of OLP lesions that were divided into three groups (G1, G2 and G3) depending on the activity and 10 of healthy patients by immunohistochemistry (staining intensity and percentage of stained cells) and results of staining were compared between the different groups. Gender, age and anatomical location were also studied. The results show that in the basal layer, an increase of *hsp27* expression in both G2 and G3 was observed when compared to G1 and control group. In contrast, a decrease of *hsp27* expression in the superficial layer was observed in all groups when compared to control group. The increased expression of *Hsp27* in the basal layer observed during the OLP evolution and the less staining in the superficial layers in all cases of OLP suggest that *hsp27* may have a role in the OLP pathogenesis.

**Second part:** This part has been carried out at the Complutense University of Madrid and at the General University Hospital Gregorio Marañón in Madrid. The aim was to analyse if the expression of the histo-blood group antigens A, B, Lewis a, b, x, y and the Heat Shock Proteins (Hsps) *hsp27*, 60,70 and 90 was different depending on the type of histological lesion analysed (Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC), areas next to the OSCCs and oral leukoplakias with different grade of dysplasia and normal mucosa). By means of immunohistochemistry, the expression of those antigens was analysed in 22 OSCC, 21 normal mucosa, 34 areas next to the OSCC and in 29 oral leukoplakias. Before any analysis, it was performed a validation for the semi-quantitative method of scoring. Results show different patterns of expression with the antigens analysed depending on the type of histological lesion. In this sense the most

relevant events were the loss of expression of the histo-blood group antigen A in Oral Squamous Cells Carcinomas (OSCCs), the aberrant expression of group B detected in an patient with OSCC belonging to group A and the total loss of *hsp90* expression in all groups except for the control group. It was also detected a variable expression of the antigens analysed depending on the grade of dysplasia. Some associations were detected between the positive or negative expression of some of the antigens analysed and certain variables. Belonging to group B and suffering from a future tumour were the more influential variables in the survival analysis. *Hsp90* demonstrated to be the more capable variable to discern between the four main groups analysed in this study. We conclude this study asking for standardized protocols to homogenize the obtained results from the different studies or to make them more comparable.

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>1. Cáncer oral.....</b>	<b>10</b>
1.1. Definición.....	10
1.2. Epidemiología.....	10
1.3. Etiología.....	11
1.4. Diagnóstico clínico.....	14
1.5. Diagnóstico histológico.....	16
1.6. Carcinogénesis.....	17
1.7. Evolución natural.....	19
1.8. Tratamiento.....	21
<b>2. Lesiones orales potencialmente malignas.....</b>	<b>22</b>
2.1. Definición.....	22
<b>2.2. Leucoplasia.....</b>	<b>23</b>
2.2.1. Definición.....	23
2.2.2. Epidemiología.....	23
2.2.3. Etiología.....	24
2.2.4. Diagnóstico clínico.....	25
2.2.5. Diagnóstico histológico.....	27
2.2.6. Transformación maligna.....	27
2.2.7. Tratamiento.....	29
<b>3. Displasia epitelial.....</b>	<b>32</b>
3.1. Definición.....	32
3.2. Clasificación.....	33
3.3. Diagnóstico diferencial.....	34
3.4. Limitaciones.....	34
<b>4. Marcadores moleculares.....</b>	<b>38</b>

<b>5. Antígenos de grupo sanguíneo ABO y Lewis.....</b>	<b>39</b>
<b>5.1. Antígenos de grupo sanguíneo ABO.....</b>	<b>39</b>
5.1.1. Definición.....	39
5.1.2. Genética.....	40
5.1.3. Epidemiología.....	41
5.1.4. Síntesis.....	42
5.1.5. Localización.....	44
5.1.6. Expresión.....	45
5.1.7. Funciones.....	46
<b>5.2. Antígenos de grupo sanguíneo Lewis.....</b>	<b>49</b>
5.2.1. Definición.....	49
5.2.2. Genética, síntesis y epidemiología.....	49
5.2.3. Localización.....	51
5.2.4. Funciones y expresión.....	51
<b>6. Proteínas de Choque Térmico.....</b>	<b>53</b>
6.1. Definición y nomenclatura.....	53
6.2. Expresión.....	54
6.3. Clasificación.....	54
6.4. Funciones.....	59
<b>7. Justificación e Hipótesis.....</b>	<b>62</b>
<b>8. Objetivos.....</b>	<b>63</b>
<b>II. PACIENTES Y MÉTODOS.....</b>	<b>64</b>
1. Diseño del estudio.....	64
2. Consentimiento del comité ético.....	64
3. Obtención del material.....	65
4. Preparación de los especímenes.....	66
5. Recuento de la expresión.....	71
6. Variables de estudio.....	74
7. Análisis estadístico.....	77

<b>III. RESULTADOS.....</b>	<b>79</b>
1. Descripción de la muestra.....	79
2. Resultados de la validación del método de recuento.....	81
3. Redacción de los resultados por marcador.....	81
4. Resultados del análisis de supervivencia.....	105
5. Árbol de decisiones.....	108
<b>IV. DISCUSIÓN.....</b>	<b>110</b>
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>141</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>142</b>
<b>VII. ANEXO.....</b>	<b>154</b>

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **1.CÁNCER ORAL**

#### **1.1.Definición**

Se define como *cáncer* a la proliferación anormal y descontrolada de células que invaden tejidos y órganos próximos y distantes y que si no son tratadas, ocasionan la muerte del individuo en cuyo seno se desarrollan. Se denomina *carcinoma* al cáncer derivado de las células epiteliales. Así, el Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE) podría definirse como una neoplasia epitelial maligna con varios grados de diferenciación<sup>(1)</sup>. Se trata del tumor maligno más frecuente de la mucosa oral, comprendiendo el 90% del total de tumores orales malignos, mientras que el 10% restante son fundamentalmente melanomas, sarcomas, carcinomas de glándulas salivales menores y carcinomas metastásicos<sup>(2)</sup>.

#### **1.2.Epidemiología**

Agrupando conjuntamente el cáncer oral y el faríngeo, se trata del sexto cáncer más frecuente en todo el mundo. Si bien la incidencia anual estimada del cáncer oral oscila alrededor de los 275.000 casos, dos tercios de los casos van aparecer en los países en desarrollo. Existe una amplia variación geográfica, con áreas caracterizadas por una alta incidencia del cáncer oral como el Sur y Sur-Este Asiático, algunas áreas del Oeste y Este de Europa, como Francia y Hungría, áreas de Latinoamérica y el Caribe y zonas de la región del Pacífico<sup>(3)</sup>.

Los datos publicados por el Ministerio de Sanidad y Consumo (*“Monográfico: La situación del cáncer en España”*) así como por la Asociación Española Contra el Cáncer muestran que la incidencia de cáncer oral en España es para los hombres de 5,7 a 12,9 casos por 100.000 habitantes/año, y para las mujeres del 0,6 al 2,1 por 100.000 habitantes/año. Con esto hablamos de una incidencia alta para los varones y media para las mujeres con respecto a Europa y al resto del mundo, no obstante es importante señalar que en Granada se registran las tasas más altas del mundo de cáncer de labio<sup>(4)</sup>.

Mundialmente la incidencia es mayor en hombres frente a mujeres debido al mayor hábito de tabaco y alcohol, aunque la incidencia varía en función de la distribución geográfica. Así en países como la India la incidencia aumenta en mujeres en relación con el hábito de mascar tabaco<sup>(1)</sup>.

La edad de aparición es fundamentalmente en las últimas décadas de la vida, sobre todo en el periodo comprendido entre los 50 y los 70 años. Se ha observado un aumento en la incidencia de COCE en las últimas décadas en la población joven, particularmente varones, en países de la Unión Europea y en áreas de los Estados Unidos <sup>(1, 3, 5)</sup>.

En Europa y Estados Unidos, del 40 al 50% de los cánceres orales van a desarrollarse en la lengua, mientras que en Asia es más frecuente el cáncer en otras localizaciones orales<sup>(3)</sup>.

Se trata de una neoplasia que causa una importante morbimortalidad, con una supervivencia a los 5 años alrededor del 50%<sup>(1, 6)</sup>. Las mujeres presentan mayores tasas de supervivencia que los hombres. La mortalidad se ha estimado en 3-4 hombres por cada 100.000 y en 1,5-2,0 mujeres por cada 100.000. En América, las tasas de mortalidad son mayores en negros que en otras razas (blancos ó hispanos)<sup>(3)</sup>.

### 1.3.Etiología

La etiología del cáncer oral es multifactorial<sup>(3)</sup>. Dentro de los mecanismos globales de carcinogénesis se reconocen dos fases ó periodos, un período de *inicio*, en el que actuarían los factores de transformación neoplásica, y un período de *promoción*, en el que se posibilitaría que el tipo celular transformado entrara en una situación de crecimiento celular tolerado<sup>(2)</sup>.

Los factores de riesgo implicados en la aparición y desarrollo del cáncer oral se agrupan como *establecidos*, entre los que se encuentra tabaco y sus variantes, el alcohol y el consumo del preparado de betel; *fuertemente sugestivos*, como la luz solar (cáncer de labio) y la radiación; *posibles*, como los virus, la deficiencia inmunitaria, alteración de la dentición y rasgos étnicos; y *especulativos* como determinados enjuagues, beber mate, la enfermedad periodontal y una historia familiar de cáncer oral<sup>(3)</sup>. Dentro de los factores de riesgo de comportamiento faltaría añadir la deficiencia en los micronutrientes esenciales de la dieta<sup>(7)</sup>.

Los factores de riesgo dominantes son el **tabaco y el alcohol** que a su vez son fuertemente sinergistas. La mayoría de los casos y muertes por cáncer oral son debidos a la existencia de una predisposición individual, unida a la existencia de características



genéticas específicas y a la exposición a carcinógenos, favorecida por el comportamiento dentro del estilo de vida.

Del 20 al 30% de los casos se atribuyen al **tabaco** fumado, más del 50% de los casos al consumo de betel sin tabaco en las áreas donde es prevalente, del 7 al 19% de los casos al alto consumo de alcohol, del 10 al 15% a la deficiencia en micronutrientes y un 3% a la infección por el virus del papiloma humano. Se ha descrito un efecto sinérgico al exponerse a dos ó más de estos factores. En el humo del tabaco están presentes más de 60 carcinógenos y en el tabaco no fumado se han identificado al menos 16. Los carcinógenos más importantes en relación con el cáncer oral son las nitrosaminas y los hidrocarburos aromáticos policíclicos , que ejercen su acción a partir de provocar aberraciones en el ADN. El riesgo de desarrollar cáncer oral es dosis-dependiente<sup>(7)</sup>. El tabaco no fumado es la principal causa de COCE oral y oro-faríngeo en India, el Sur-Oeste Asiático, China y Taiwan, así como en aquellos países donde emigran estas poblaciones, especialmente debido a la consumición de preparados de betel que contienen nuez de areca e hidróxido de calcio (lima). No se sabe claramente el mecanismo de acción de los carcinógenos en la nuez de betel . Las formas de tabaco en polvo para esnifar utilizado en Escandinavia y Norte-América parecerían ser menos carcinogénicas, si bien, causan adición a la nicotina<sup>(1, 7)</sup>.

El **consumo regular de alcohol** se asocia con un riesgo aumentado de desarrollar cáncer oral. Dicha asociación es dosis-dependiente y el riesgo aumenta en los bebedores fumadores ó mascaradores de tabaco ó betel. Sin embargo, también se ha observado un riesgo significativamente aumentado entre los fumadores no bebedores y en menor extensión en los no fumadores y grandes bebedores. Se ha tratado de observar si existen diferencias entre el vino, la cerveza y los licores fuertes y, en general, se ha podido apreciar que todas las bebidas alcohólicas suponen un riesgo, hallándose las diferencias en relación con las costumbres socio-culturales que existen en las diferentes poblaciones<sup>(1)</sup>. La enzima alcohol-deshidrogenasa oxida el etanol en acetaldehído siendo este el principal responsable de la carcinogénesis dado sus múltiples efectos mutagénicos en el ADN<sup>(7)</sup>. En relación con el contenido en alcohol de ciertos **colutorios** y el riesgo de cáncer oral, a día de hoy no existe suficiente evidencia epidemiológica para sustentar tal asociación<sup>(8)</sup>.

Existe un número limitado de estudios que analicen la asociación entre las **enfermedades periodontales** y el riesgo de cáncer oral, si bien a día de hoy existe controversia, en algunos estudios sí se ha demostrado esta asociación tras controlar el efecto del tabaco. Entre las posibles teorías que vinculan esta asociación estaría la que considera que la inflamación crónica inducida por los patógenos periodontales serviría para promocionar a las células ya transformadas, alterando el control del crecimiento celular. Otro efecto directo de los patógenos periodontales sería la producción de nitrosaminas carcinogénicas<sup>(9)</sup>.

Algunos estudios muestran asociación del riesgo del desarrollo del cáncer oral con **deficiencias en la dieta** del consumo de fruta, vegetales no almidonados y alimentos con contenido en carotenos, si bien, el mecanismo etiopatogénico no está del todo esclarecido<sup>(7)</sup>.

La **susceptibilidad genética** al COCE es especialmente significativo en los pacientes jóvenes y se basa en las diferencias heredadas a la hora de metabolizar carcinógenos, de reparar el ADN y del control del ciclo celular. La existencia de agregación familiar en el cáncer oral, posiblemente con herencia autosómica dominante, se ha descrito solamente en un porcentaje muy bajo de pacientes y los genes responsables no se conocen hoy día<sup>(10)</sup>.

La infección por el **Virus del Papiloma Humano(VPH)** y su potencial relación con el desarrollo de cáncer oral se lleva investigando desde hace años. La familia de los papilomavirus es un grupo diverso de virus ADN sin envoltura. Su mecanismo de acción es mediante la interacción con las células basales proliferativas indiferenciadas de la mucosa epitelial que quedan expuestas tras un trauma tisular. Las proteínas del HPV, especialmente las oncoproteínas E6 y E7 de los virus de HPV de alto riesgo, interaccionan, con distinto grado de afinidad, con las células del huésped alterando la diferenciación epitelial normal y la apoptosis mediante la estimulación de la proliferación celular, la síntesis de ADN y la inhibición de los reguladores del ciclo celular. La expresión mantenida de dichas oncoproteínas acaba provocando una inestabilidad genómica con mutaciones que pueden provocar la transformación maligna<sup>(11)</sup>. Los VPHs, especialmente aquellos genotipos con potencial oncogénico conocido en el cuello uterino y en la piel como el VPH 16 y 18, se encuentran en una proporción variable y pequeña en los casos de cáncer oral y hasta en un 50% de los

casos en los COCEs amigdalinos y orofaríngeos, especialmente los primeros. Se especula que la infección por el VPH, quizá debido al contacto oral/genital, podría ser importante en algunos casos<sup>(1)</sup>. En una revisión sistemática llevada a cabo por Syrjänen y cols. en 2011, se detectó una fuerte asociación entre la presencia del VPH, específicamente el VPH 16 y el COCE, con una *Odds Ratio* (OR) de 3,98 al hacer la comparación con el grupo control. Asimismo detectaron una fuerte asociación entre la presencia del VPH, de nuevo más marcada con el VPH 16, y la existencia de lesiones potencialmente malignas como el liquen plano oral, la leucoplasia y la existencia de displasia epitelial<sup>(11)</sup>.

#### 1.4. Diagnóstico clínico

Un carcinoma oral puede manifestarse en **estadios precoces** como una *lesión eritroplásica persistente*, con una duración superior a 30-45 días, que no está relacionada con ningún factor irritante local, como prótesis ó dientes. Es la forma más frecuente de presentación. Los signos de rugosidad, induración ó granulación se asocian con la invasión<sup>(12)</sup>. También puede presentarse como una *lesión combinada blanca y roja*, eritro-leucoplasia, persistente, o como una *erosión y ulceración* de un diámetro no superior al centímetro, con bordes ligeramente evertidos, suelo sucio y consistencia dura a la palpación. En ocasiones aparece como una tumoración pequeña de aspecto *verrugoso* o simplemente como la *falta de cicatrización* de un alveolo tras una extracción dental<sup>(13)</sup>. En un **estadio más avanzado** el COCE puede presentarse bajo tres formas clínicas denominadas *tipo exofítico*, con crecimiento de forma vegetante, hacia fuera, observándose una tumoración de superficie irregular y dura a la palpación, *tipo endofítico ó ulcerado*, que corresponde a la típica úlcera neoplásica, la cual se caracteriza por tener una forma irregular, con bordes evertidos, fondo sucio y en la palpación se percibe dureza y sensación de infiltración en los tejidos profundos, y *tipo mixto*, en el que aparecen asociadas las dos formas anteriores<sup>(14)</sup>.

El **tamaño** de las lesiones es variable y oscila entre unos milímetros y varios centímetros en los casos avanzados<sup>(1)</sup>.

Respecto a la **localización** de los carcinomas orales, el 75% de los COCEs se han descrito en un área que comprende el suelo de la boca y la mucosa lingual adyacente, el surco sublingual y la región retromolar. Esta región constituye sólo el 20% del área mucosa total y constituye una zona de susceptibilidad aumentada denominada

“área de drenaje”<sup>(1)</sup>. Se trata de zonas más expuestas a los carcinógenos presentes en la secreción salival, lo que asociado a una mayor permeabilidad en el epitelio, como han demostrado ciertos estudios experimentales, hace que se le atribuya el mayor riesgo de transformación maligna<sup>(15)</sup>. Un análisis de tumores pequeños asintomáticos muestra la alta tendencia de estos a aparecer en el suelo de la boca, área ventrolateral lingual y en la zona del paladar blando. De esta forma, los tumores se originan en estas áreas pero se extienden para afectar otras localizaciones como la lengua y es en estas zonas cuando son detectados y clasificados como tumores linguales<sup>(1)</sup>. El COCE de lengua es más agresivo que otras formas de COCEs, ya que presenta propensión a la rápida invasión local y extensión<sup>(16)</sup>.

Los COCEs suelen presentarse de forma **asintomática** ó con mínimos síntomas y signos físicos. Las características clínicas pueden variar dependiendo del área de localización. Como síntomas y signos más relevantes encontramos la sensación de hinchazón y ulceración mucosa, dolor, dolor reflejo en la oreja, halitosis, dificultad al hablar, al abrir la boca y al masticar, sangrado, pérdida de peso e hinchazón a nivel del cuello. En ocasiones, los pacientes presentan nódulos cervicales aumentados sin ninguna sintomatología a nivel intraoral. Los cánceres extremadamente avanzados se presentan como crecimientos ulcero-proliferativos con áreas de necrosis extendiéndose a las estructuras vecinas como hueso, músculo y piel. En los estadios terminales se presentan a veces fistulas orocutáneas, sangrado continuo, anemia severa y caquexia. La duración de los síntomas y la rapidez de crecimiento pueden indicar la agresividad del tumor<sup>(1)</sup>.

En el **diagnóstico** del cáncer oral lo primero es realizar una exploración física que incluye la inspección visual y la palpación de todas las superficies mucosas, palpación bimanual del suelo de la boca y detección clínica de la posible afectación de los ganglios cervicales. El diagnóstico se confirma con una biopsia combinada comúnmente con una citología por punción y aspiración con aguja fina (PAAF) para comprobar la afectación ganglionar, teniendo que realizar en ocasiones la biopsia excisional de los nódulos linfáticos. En la búsqueda de un posible tumor primario suele realizarse una faringo-laringoscopia que suele incluir biopsia de las localizaciones de riesgo como base de la lengua y nasofaringe, entre otras. Los pacientes con cáncer oral tienen riesgo de desarrollar múltiples tumores primarios a nivel de la faringe o laringe y en la región traqueo-bronquial y esófago, por lo que también suele llevarse a cabo una

panendoscopia de rutina. Otras herramientas utilizadas para el diagnóstico del cáncer oral son las radiografías intraorales y la ortopantomografía para detectar una posible afectación ósea. Asimismo, para suplementar la evaluación clínica y para llevar a cabo el estadiaje del tumor primario, se suelen realizar pruebas de tomografía computarizada y de resonancia magnética, que a su vez aportarán información sobre la posible afectación linfática. Concretamente la tomografía computarizada aportará información sobre la afectación de la cortical ósea y la resonancia magnética sobre la afectación de los tejidos blandos y el paquete neurovascular. De forma rutinaria, aunque la metástasis a distancia del cáncer oral es poco frecuente al inicio, suele realizarse una radiografía de tórax para descartar metástasis pulmonar<sup>(1)</sup>.

### **1.5. Diagnóstico histológico**

La anatomía patológica del carcinoma epidermoide muestra la presencia de invasión hacia el tejido conjuntivo subyacente con la consiguiente posibilidad de que las células epiteliales malignas erosionen los vasos linfáticos y sanguíneos, haciendo posible la metástasis. El potencial metastásico viene correlacionado en cierta medida con la variedad histológica con la que se corresponde el carcinoma, la cual, a su vez, se relaciona con el *grado de diferenciación* que presentan las células tumorales y con la similitud existente entre la arquitectura del tejido y la correspondiente al epitelio plano estratificado normal. Así, los tumores que producen cantidades importantes de queratina y presentan algunos rasgos de maduración desde células basales a queratina se consideran *bien diferenciados*. Estos tumores están constituidos por elementos epiteliales dispuestos en nidos, cordones ó masas sólidas con límites bien definidos. Las mitosis no suelen ser muy abundantes, pero se detectan de forma aisladas mitosis atípicas. Es frecuente encontrar un intenso infiltrado peritumoral formado por linfocitos y células plasmáticas. Los tumores que producen escasa o nula queratina, pero en los cuales el epitelio todavía es reconocible como plano estratificado, a pesar de su importante desviación de la normalidad, se consideran como *moderadamente diferenciados*. La presencia de queratina es menor, y en ocasiones se producen fenómenos de queratinización individual de una célula conocidos como disqueratosis. El número de mitosis suele ser más elevado y el infiltrado peritumoral menor. Por último, los tumores que no producen queratina, tienen poco parecido con el epitelio plano estratificado, muestran una falta significativa de patrón estructural normal y de cohesión de las células, y que presentan anomalías celulares extensas y un gran número

de mitosis se designan como *poco diferenciados*, *mal diferenciados* ó *indiferenciados*. Los tumores se clasificarán según el área más indiferenciada <sup>(14, 17)</sup>.

En general los parámetros más importantes a valorar en relación con la histología del COCE son la queratinización, la existencia de mitosis, el pleomorfismo nuclear, el modo de invasión, el grado o estadio de invasión y la respuesta inflamatoria <sup>(14)</sup>.

## 1.6. Carcinogénesis

El cáncer parece ser el resultado de la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas que afectan la práctica totalidad de los mecanismos reguladores de la división y diferenciación celulares <sup>(14)</sup>.

Cuando un **proto-oncogén**, es decir, un gen implicado en los procesos de crecimiento, maduración y proliferación celulares sufre una alteración en su secuencia genética, que afecta a su función normal, se transforma en un **oncogén**. Los productos codificados por los oncogenes son productos relacionados con la proliferación y diferenciación celulares, como factores de crecimiento, enzimas y proteínas nucleares. En el carcinoma epidermoide de la cavidad oral los oncogenes más estudiados son los miembros de la familia *myc* y los de la familia *ras*. Existen numerosos mecanismos de seguridad que previenen la fácil activación de un oncogén, destacando la presencia de los **anti-oncogenes** ó genes supresores tumorales, que actuarán como centinelas del genoma. Distinguimos el gen del Retinoblastoma (Rb), importante inhibidor del ciclo celular, el gen p53, que actúa como gen supresor tumoral al inhibir la transformación y la proliferación celulares, evitando la perpetuación de células con aberraciones cromosómicas con riesgo de sufrir una transformación neoplásica <sup>(14)</sup>.

En el proceso de la carcinogénesis acontecen una serie de eventos genéticos que permiten adquirir el fenotipo maligno. Según la hipótesis propuesta por Hanahan y Weinberg en el año 2000, la inestabilidad genética permite a la célula adquirir eventualmente las seis características típicas de la mayoría de los cánceres. Estas son la autosuficiencia en las señales de crecimiento, la insensibilidad frente a las señales de inhibición del crecimiento, la habilidad para evadir la apoptosis, la angiogénesis mantenida, la invasión tisular y metástasis y el potencial replicativo ilimitado <sup>(18)</sup>. Cada

una de estas rutas viene regulada por grupos de sub-rutas que interactúan añadiendo una mayor complejidad al proceso de malignización<sup>(19)</sup>.

El concepto de **cancerización de campo** se utiliza para explicar por qué un cambio premaligno puede ocurrir en cualquier parte de la membrana mucosa expuesta a carcinógenos y por qué los pacientes con lesiones precancerosas ó cancerosas tienen riesgo de desarrollar lesiones múltiples primarias, tanto sincrónica como metacrónicamente, en el tracto aerodigestivo superior. Estas lesiones se consideran normalmente desde el punto de vista biológico como no relacionadas ó clonalmente independientes, aunque un porcentaje de las mismas surgirán a partir de la extensión mucosa de células relacionadas clonalmente. La afectación multifocal afecta del 3% al 24% de los pacientes. Estos pacientes representan un grupo aparte en relación con poseer una cierta susceptibilidad genética y una característica forma de presentación, aunque se sabe poco y quedan respuestas por resolver como que si es importante el área total de la mucosa afectada en relación con el riesgo de transformación maligna, o si las lesiones sincrónicas y metacrónicas se comportan de un modo diferente ó qué importancia tiene el tabaco y el alcohol, ó el cese del hábito, en la progresión de la enfermedad<sup>(20)</sup>. Se ha sugerido que el cáncer oral es una manifestación de la “*cancerización de campo*”, es decir, la actuación de estímulos carcinogénicos repetidos en la superficie oral al completo, predispone a la totalidad del “campo” de tejido al desarrollo de múltiples focos malignos primarios<sup>(21)</sup>. Según el concepto de cancerización de campo, la mucosa oral puede verse afectada más ampliamente por cambios genéticos y moleculares que lo que puede detectarse clínica y microscópicamente<sup>(5)</sup>. En muchos casos, la recurrencia tumoral local refleja la extensión de células genéticamente dañadas más allá de los márgenes clínicos y microscópicos del carcinoma hacia los márgenes de la resección quirúrgica<sup>(1)</sup>.

El modelo clásico de la carcinogénesis sustenta la idea de que prácticamente cualquier célula cancerosa tiene potencial para constituir un tumor, sin embargo, otra teoría, la teoría de la “*stem cell*”, aboga por la existencia de una subpoblación celular, denominadas *stem cells* que pueden auto-renovarse y producir células diferenciadas que constituyen la mayor parte del tumor. Estas células tendrían un fenotipo diferente que las haría más resistentes a la quimioterapia y radioterapia. El marcador de superficie CD44 parecería ser efectivo a la hora de detectarlas aunque existe variabilidad en función del origen del tejido a analizar<sup>(10)</sup>.

## 1.7. Evolución natural

A medida que el tumor crece va infiltrando estructuras vecinas llegando a embolizar vasos linfáticos y sanguíneos, produciendo **metástasis** en los ganglios linfáticos y en los órganos situados a distancia de la cavidad oral. El mecanismo de diseminación en los ganglios linfáticos suele ser por embolización. Los tumores de la línea media, sobretudo en la zona posterior lingual ó en el paladar blando, pueden diseminarse bilateralmente. Las metástasis por vía sanguínea no son muy frecuentes, habiéndose referido porcentajes que oscilan entre el 7 y el 12%. Los órganos que más se afectan son los pulmones, el hígado y los huesos<sup>(1)</sup>.

Para poder diagnosticar que se trata de una metástasis ha de cumplir los criterios de *Clausen y Poulsen* que incluyen la comprobación histológica de que se trata de un tumor maligno y el tipo celular, la existencia del tumor primario comprobado histológicamente y la correlación histológica entre el tumor primario y la metástasis. Asimismo no ha de haber evidencia de extensión directa desde el tumor primario<sup>(22)</sup>. La localización más frecuente es la encía, la lengua y los labios, presentándose en ocasiones más de un depósito. El aspecto clínico es variado, y en ocasiones se ha de plantear el diagnóstico diferencial con tumores benignos, como el granuloma piógeno, el fibroma ó el granuloma de células gigantes, siendo la gran rapidez de crecimiento y el gran tamaño que alcanzan en poco tiempo los datos que los diferencian<sup>(14)</sup>.

El **estadiaje** se lleva acabo siguiendo la clasificación TNM que considera el tamaño tumoral, la existencia de nódulos y la existencia de metástasis. Los estadios I y II se consideran iniciales y la tasa de supervivencia suele ser elevada; los estadios III y IV se consideran avanzados y la tasa de supervivencia es muy baja. *Ver Figura 1*. Los **factores pronóstico** más significativos son el tamaño tumoral y el estatus nodal. Los tumores invasivos con márgenes definidos son menos agresivos que aquellos con un frente no cohesivo que muestran una diseminación difusa de pequeñas hileras ó células aisladas. Los principales factores de riesgo que influyen adversamente el pronóstico son la existencia de dos ó más nódulos regionales positivos, la extensión extracapsular de la enfermedad ganglionar ó la existencia de márgenes de resección positivos. Otras características histológicas importantes asociadas con un mal pronóstico son el grosor tumoral y la invasión vascular<sup>(1)</sup>. Se ha propuesto que un espesor “tumoral medio crítico” para el cáncer oral y orofaríngeo podría ser de 4mm, así los tumores de más espesor



tienen un riesgo cuatro veces superior de desarrollar metástasis que los tumores de menor espesor<sup>(23)</sup>.

CLASIFICACIÓN TNM DE LOS CARCINOMAS DE LA CAVIDAD ORAL			
<b>T- Tumor primario</b>			
<b>TX</b>	Tumor primario no puede detectarse		
<b>T0</b>	No evidencia de tumor primario		
<b>Tis</b>	Carcinoma <i>in situ</i>		
<b>T1</b>	Tumor ≤ 2cm en su mayor dimensión		
<b>T2</b>	Tumor entre ≥ 2cm y ≤ 4cm en su mayor dimensión		
<b>T3</b>	Tumor >4cm en su mayor dimensión		
<b>T4a</b>	Tumor invade la cortical ósea, los músculos profundos/extrínsecos de la lengua (geniogloso, hipogloso, palatogloso y estilogloso), el seno maxilar ó la piel de la cara		
<b>T4b</b>	Tumor invade el espacio masticatorio, las apófisis pterigoides ó la base del cráneo; ó engloba a la arteria carótida interna		
Nota: Una erosión superficial aislada en hueso/surco dental en un primario en encía no es criterio suficiente para clasificar el tumor como un T4.			
<b>N-Nódulos linfáticos regionales</b>			
<b>NX</b>	Nódulos linfáticos regionales no pueden detectarse		
<b>N0</b>	No metástasis a nódulos linfáticos regionales		
<b>N1</b>	Metástasis en un nódulo linfático unitario ipsilateral, ≤3cm en su mayor dimensión		
<b>N2</b>	Metástasis como se especifica en N2a, 2b y 2c		
<b>N2a</b>	Metástasis en nódulo linfático unitario ipsilateral, entre >3cm y <6cm en su mayor dimensión		
<b>N2b</b>	Metástasis en múltiples nódulos linfáticos ipsilaterales, no >6cm en su mayor dimensión		
<b>N2c</b>	Metástasis en nódulos linfáticos bilaterales ó contralaterales, no >6cm en su mayor dimensión		
<b>N3</b>	Metástasis en un nódulo linfático >6cm en su mayor dimensión		
Nota: los nódulos linfáticos de la línea media se consideran nódulos ipsilaterales			
<b>M-Metástasis a distancia</b>			
<b>MX</b>	No puede detectarse metástasis a distancia		
<b>M0</b>	No hay metástasis a distancia		
<b>M1</b>	Metástasis a distancia		
<b>ESTADIAJE</b>			
<b>Estadiaje 0</b>	Tis	N0	M0
<b>Estadiaje I</b>	T1	N0	M0
<b>Estadiaje II</b>	T2	N0	M0
<b>Estadiaje III</b>	T1,T2	N1	M0
	T3	N0,N1	M0
<b>Estadiaje IVA</b>	T1,T2,T3	N2	M0
<b>Estadiaje IVB</b>	Cualquier T	N3	M0
	T4b	Cualquier N	M0
<b>Estadiaje IVC</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1

**Fig.1. Clasificación TNM (American Joint Comité, Unión internacional Contra Cáncer) de los carcinomas de la cavidad oral. Modificada de IARC<sup>(1)</sup>.**

## **1.8. Tratamiento**

El tratamiento del COCE de la cavidad oral es multidisciplinario, ya que participan diferentes especialistas formando comités clínicos. Los métodos terapéuticos más importantes son la cirugía y la radioterapia, bien de forma aislada ó en combinación, dependiendo del estadio clínico en el que se encuentre el tumor. La quimioterapia es la tercera alternativa reservada para los casos muy avanzados ó en los que, debido al estado físico del paciente ó a su edad, no están indicados otros tipos de tratamiento<sup>(1)</sup>. Es importante señalar los efectos secundarios de la radioterapia y la quimioterapia, como la mucositis , la xerostomía, las alteraciones del gusto, alteraciones de los dientes, necrosis de los tejidos blandos y otras más severas como la osteorradionecrosis y la inmunosupresión<sup>(14)</sup>.

## 2. LESIONES ORALES POTENCIALMENTE MALIGNAS

### 2.1. Definición

En el *workshop* de la Organización Mundial de la Salud llevado a cabo en 2005 se trataron de aclarar los conceptos en relación a la nomenclatura, definiciones y clasificaciones en el ámbito de la cancerización oral. En este sentido, acuerdan denominar como *lesiones potencialmente malignas* a aquellas en las que habiendo sido identificadas inicialmente como *lesiones precancerosas* se ha podido observar su malignización a lo largo del seguimiento en estudios longitudinales, se ha visto una coexistencia en los márgenes de Carcinomas Orales de Células Escamosas evidentes, se han detectado alteraciones morfológicas y citológicas similares a las observadas en lesiones epiteliales malignas pero sin haber invadido el tejido conectivo y se han podido identificar algunas de las alteraciones cromosómicas, genómicas y moleculares encontradas en carcinomas orales claramente invasivos. Dentro de este concepto quedarían incluidas todas las presentaciones clínicas que conllevan un *riesgo* de malignizarse, unificando de esta manera en un solo grupo las lesiones y condiciones precancerosas propuestas en el anterior *workshop* y abandonando tal distinción dado que no había quedado justificada<sup>(24)</sup>. La *Figura 2* muestra las lesiones orales catalogadas como potencialmente malignas.

Lesiones orales potencialmente malignas
Leucoplasia
Eritroplasia
Lesiones palatinas en fumadores invertidos
Fibrosis oral submucosa
Queratosis actínica
Liquen plano
Lupus eritematoso discoide
Enfermedades hereditarias: disqueratosis congénita, epidermólisis bullosa

Fig.2. Lesiones potencialmente malignas. WHO,2005<sup>(24)</sup>.

## 2.2. Leucoplasia

### 2.2.1. Definición

El término *leucoplasia* fue propuesto en 1877 por Ernst Schimmer a partir de las palabras griegas “leuco”, blanco, y “plakos”, placa, cuando detectó una serie de lesiones blancas en la lengua que se transformaron en cáncer en pacientes que padecían de sífilis terciaria<sup>(25)</sup>. Desde el primer *workshop* llevado a cabo en 1978 por la Organización Mundial de la Salud, la leucoplasia oral quedó definida como “un parche ó placa blanca que no puede caracterizarse ni clínica ni patológicamente como otra enfermedad”. En posteriores reuniones poco se añadió a la definición de leucoplasia resultando el término bastante ambiguo<sup>(26)</sup>. En un intento por superar esto, en el último *workshop* se ha acuñado la siguiente definición de *leucoplasia*: “placas blancas con riesgo de malignización cuestionable habiendo excluido otras enfermedades o alteraciones conocidas que no conllevan un riesgo aumentado de cáncer”<sup>(24)</sup>. En la *Figura 3* pueden observarse el conjunto de enfermedades de la mucosa oral que no conllevan un riesgo aumentado de malignización.

Lesiones sin potencial de malignización	
Quemadura por aspirina	Lupus eritematoso
Candidiasis pseudomembranosa	Morsicatio
Candidiasis hiperplásica	Papiloma y lesiones relacionadas
Lesión friccional	Sífilis secundaria
Leucoplasia vellosa	Lesiones inducidas por tabaco y rapé (no fumar invertido)
Leukoedema	Estomatitis nicotínica
Línea alba	Nevus blanco esponjoso

**Fig.3. Lesiones sin potencial de malignización.** Modificada de van der Waal, 2008<sup>(27)</sup>.

### 2.2.2. Epidemiología

Los estudios de *incidencia* de leucoplasia oral son raros y se han llevado a cabo en la India. Las personas con hábito tabáquico, fumado ó mascado, presentan una tasa de incidencia anual mayor que las personas sin dicho hábito, por lo que se han descrito cifras que oscilan desde los 0.6/1000 hasta los 30.2/1000. Asimismo, en estudios en

Japón, se han obtenido cifras incluso mayores aunque el factor asociado al desarrollo de leucoplasias difería del de la población hindú<sup>(28)</sup>. La *prevalencia* estimada mundial de leucoplasia varía del 1 al 5%<sup>(28)</sup>. En una revisión sistemática llevada a cabo por Petti y cols., la prevalencia mundial de la leucoplasia oral es del 2.6% aunque se apreció un alto grado de heterogeneidad entre los estudios<sup>(29)</sup>.

En relación con la edad, en los países desarrollados, las leucoplasias suelen encontrarse en las personas de edad media, sobretudo entre la cuarta y séptima década de la vida, mientras que en los países en desarrollo suelen ocurrir de 5 a 10 años antes. En relación con el género, según la revisión sistemática de Petti, se confirma que la leucoplasia afecta a los hombres al menos tres veces más que a las mujeres sin que se encuentren diferencias geográficas, lo que se atribuye al uso global del tabaco y el alcohol<sup>(29)</sup>.

### 2.2.3. Etiología

El establecimiento de un factor etiológico para una lesión blanquecina excluye el diagnóstico de leucoplasia, excepto en el caso del tabaco. Las infecciones por *Cándida*, papilomavirus y el virus de Epstein Barr son cofactores que pueden modificar el pronóstico evolutivo de la leucoplasia ya establecida<sup>(27)</sup>.

El **tabaco** es el principal factor predisponente para el desarrollo de leucoplasias, no obstante existe una proporción de lesiones no asociadas a alguna causa conocida. En los países en desarrollo, la mayoría de las leucoplasias se asocian al tabaco ó a la nuez de areca, de forma independiente ó combinados. En los países desarrollados, la mayoría de las leucoplasias también se asocian con el hábito tabáquico. La forma de consumo del tabaco influye en la distribución de las lesiones. Así, el fumar invertido provoca lesiones en el paladar duro, el tabaco mascado provoca lesiones en la zona de depósito del tabaco, fumar puros se asocia con leucoplasias en el suelo de la boca y fumar cigarrillos provoca lesiones en la mucosa vestibular y en las comisuras. La frecuencia del consumo de tabaco aumenta la probabilidad de desarrollo de leucoplasias, ya que los grandes fumadores tienen siete veces más de probabilidad de desarrollar leucoplasias que los no fumadores. La influencia del tabaco se confirma con la desaparición de las lesiones tras el cese del hábito, aunque un número significativo de leucoplasias no tendrán relación con estos factores etiológicos<sup>(28)</sup>.

Aunque el papel del **alcohol** es indudable en la etiología del COCE, en relación con el desarrollo de leucoplasias los estudios muestran resultados contradictorios al valorar el alcohol como un factor de riesgo independiente. Lo que sí está claro es el efecto sinérgico entre el alcohol y el tabaco<sup>(28)</sup>.

En relación con el **virus del papiloma humano** los estudios muestran resultados contradictorios<sup>(27, 28)</sup>.

Se ha descrito la relación entre el uso de colutorios y dentífricos que utilizan la **sanguinarina** como principio activo (Viadent®) y la presencia de lesiones leucoplásicas, especialmente en el fondo de vestíbulo<sup>(30)</sup>, aunque estas lesiones no deberían considerarse como leucoplasias, ya que se conoce el factor etiológico y no se trata del tabaco. Algunos autores hablan de queratosis inducida por sanguinarina ó reacción liquenoide asociada con sanguinarina<sup>(31)</sup>.

En los pacientes inmunodeprimidos por ejemplo por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) ó tras trasplantes de órganos sólidos, se ha descrito un riesgo aumentado de cáncer o de rápida progresión de leucoplasia a cáncer<sup>(27)</sup>.

La implicación de especies de **Cándida** en la etiología ó en la progresión de las leucoplasias es controvertida. Diversos tipos de *Cándida* productores de nitrosaminas, diferentes a la variante *albicans* común, se han aislado de leucoplasias clínicamente heterogéneas con displasia histológica. Se ha podido observar que la eliminación del hongo provoca la transformación de la variante heterogénea en una variante homogénea<sup>(6)</sup>.

#### 2.2.4. Diagnóstico clínico

Clínicamente se distinguen dos tipos de leucoplasia, *homogénea* y *no-homogénea*. Esta distinción se hace en base a las características de color y morfología de la superficie que a su vez muestran alguna relación con la evolución ó pronóstico de la lesión. Las *leucoplasias homogéneas* se muestran con una superficie uniformemente lisa, delgada y con hendiduras superficiales en la superficie de queratina. El riesgo de transformación maligna es relativamente bajo, en torno al 5%. Las *leucoplasias no-homogéneas* han sido definidas como lesiones blancas y rojas (eritro-leucoplasia) y llevan implícito un mayor riesgo de transformación maligna, en torno al 25%. Dentro del tipo *no-homogénea* tenemos las siguientes variedades:

- *Leucoplasia moteada*: mixta, blanca y roja, pero con un carácter predominantemente blanco;

- *Leucoplasia nodular*: sobrecrecimientos pequeños de tipo polipoide , excreciones redondeadas rojas ó blancas;

- *Leucoplasia verrugosa*: superficie con apariencia arrugada u ondulada. Clínicamente es indistinguible del aspecto clínico de un carcinoma verrugoso. La *leucoplasia verrugosa proliferativa (LVP)* es un subtipo de leucoplasia verrugosa que merece mención aparte, ya que se presenta con un comportamiento clínico más agresivo en relación a su tendencia a la multifocalidad, a la elevada probabilidad de recurrencia y a la alta tasa de transformación maligna, en torno al 80%. Se presenta clínicamente como múltiples leucoplasias simultáneas, multifocales y cubriendo un gran área. La secuencia clínica que suele seguir la LVP es desde una simple hiperqueratosis hasta una hiperplasia verrugosa, carcinoma verrugoso y COCE. En una necesidad por hacer una correcta detección de la lesión, varios autores han propuesto diferentes criterios diagnósticos que aún a día de hoy requieren de una validación<sup>(6, 24, 27, 32)</sup>.

Aunque esta clasificación de leucoplasia homogénea/no homogénea se considera imprecisa y de valor limitado, sí debe tenerse en cuenta que aquellas lesiones mixtas tienen un mayor riesgo de sufrir transformación maligna, denominándose en general a estas lesiones *eritro-leucoplasia*<sup>(24)</sup>.

Otras **descripciones clínicas** que ayudan a la caracterización de la leucoplasia son la descripción etiológica, claramente asociada con tabaco ó nuez de areca ó, por otro lado, idiopática, la descripción de la localización dando información anatómica sobre la sub-localización en la boca u orofaringe , ICD-DA: C00, C02-C06 y el tamaño ó extensión de la lesión ó lesiones<sup>(27)</sup>.

Se llevará a cabo un *diagnóstico provisional* de leucoplasia cuando una lesión predominantemente blanca no pueda diagnosticarse clínicamente como otra enfermedad ó alteración de la mucosa oral. El *diagnóstico definitivo* tendrá lugar cuando se haya excluido cualquier causa etiológica sin incluir el tabaco o la nuez de areca y cuando el análisis histopatológico no haya confirmado cualquier otra alteración específica<sup>(24, 33)</sup>.

La evolución de la leucoplasia puede ser el desarrollo de un COCE, siendo ésta la complicación más temida, aunque otras posibilidades son la persistencia sin cambios

durante toda la vida del paciente, un agrandamiento que se extiende por una mayor parte de la mucosa oral ó una reducción de tamaño ó incluso, la desaparición completa<sup>(28)</sup>.

En relación al *diagnóstico diferencial* de la leucoplasia hay que descartar otras entidades muy bien definidas que pueden cursar con lesiones blanquecinas en la mucosa oral. *Ver Figura 4.*

Diagnóstico diferencial de la leucoplasia oral	
Leucoedema	Leucoplasia oral vellosa
Nevo blanco espongiforme	Línea alba
Morsicatio buccarum	Lupus eritematoso
Dermatitis de contacto	Liquen plano oral
Estomatitis nicotínica	Lúes secundaria
Carcinoma escamoso y verrugoso	Queratosis friccional

**Fig.4. Diagnóstico diferencial de la leucoplasia oral<sup>(6)</sup>.**

#### 2.2.5. Diagnóstico histológico

El término *leucoplasia* describe el aspecto clínico de la lesión no teniendo ningún tipo de connotación histopatológica. En este sentido, las alteraciones del epitelio oscilan desde reacciones fisiológicas normales hasta cambios benignos, premalignos y malignos<sup>(17, 24)</sup>.

Las alteraciones epiteliales más comunes son un aumento de espesor de la capa de queratina, hiperortoqueratosis o hiperparaqueratosis, y un aumento de espesor del estrato espinoso, acantosis, ó atrofia. Por otro lado, puede darse la presencia o no de *displasia epitelial*<sup>(24)</sup>. La hiperqueratosis moderada y la hiperplasia epitelial no displásica son los hallazgos histológicos más frecuentemente descritos en la leucoplasia<sup>(6)</sup>.

#### 2.2.6. Transformación maligna

El hecho de que algunas leucoplasia han sufrido transformación maligna durante su evolución clínica<sup>(34-37)</sup> y que se han encontrado leucoplasias en los bordes de



COCEs<sup>(36)</sup> refuerza la idea de que la leucoplasia oral es una lesión potencialmente maligna. La prevalencia de leucoplasias en pacientes diagnosticados de COCE varía según los estudios desde el 15% hasta el 60%<sup>(38)</sup>. Algunos autores comentan que las lesiones iniciales son rojas, pequeñas e incluso microscópicas, lo que puede dificultar su diagnóstico<sup>(39, 40)</sup>.

Algunos autores han observado que la mayoría de los COCEs no vienen precedidos por lesiones premalignas, emergiendo *de novo* en una mucosa clínicamente normal<sup>(39)</sup>. Entre un 16 y un 62% de los COCEs se han asociado a la presencia de leucoplasia oral en el momento del diagnóstico, por lo que se trata de una entidad estrechamente asociada al cáncer de cabeza y cuello<sup>(6)</sup>. Se ha sugerido que los COCEs que emergen de lesiones pre-existentes se comportan menos agresivamente que aquellas en las que el tumor aparece *de novo*<sup>(41, 42)</sup>, lo que podría indicar que existen varios caminos para el desarrollo del COCE. Asimismo, se ha podido observar como pacientes diagnosticados de COCE con leucoplasias concomitantes presentaban estadios tumorales menos avanzados que aquellos en los que sólo existían COCEs<sup>(38)</sup>. La leucoplasia puede predecir a la aparición del cáncer en meses ó años, ó pueden estar presentes de forma adyacente al COCE cuando este es diagnosticado<sup>(43)</sup>. Las lesiones malignas pueden desarrollarse en la misma zona de la leucoplasia pre-existente así como en cualquier lugar de la cavidad oral o del tracto aerodigestivo superior<sup>(44)</sup>.

Hay autores que describen cifras de malignización de hasta un 14% en leucoplasias con un grado inicial de displasia leve, mientras que se ha venido constatando una tendencia entre los diversos autores a considerar las leucoplasias con displasia leve como de bajo riesgo de malignización<sup>(45)</sup>. En la revisión sistemática llevada a cabo por Petti y cols. se calculó una tasa de transformación global de un 1.36% por año. Esto supondría que deberían darse más casos de COCE de los que se dan sugiriendo que esta discrepancia podría deberse a la falta de información de casos de COCE en los países en desarrollo<sup>(28)</sup>.

Se han descrito una serie de factores asociados con un riesgo estadísticamente significativamente aumentado de transformación maligna, considerándose principalmente la presencia de displasia epitelial, normalmente correlacionada con un subtipo no-homogéneo, eritro-leucoplásico. Otros factores serían el género femenino, leucoplasia de larga duración, leucoplasia en no-fumadores (idiopática), localización en

lengua y/o suelo de la boca y tamaño mayor de 200 mm<sup>2</sup>. También se ha comentado como factor de riesgo la presencia de *Candida albicans* a pesar de que este microorganismo suele presentarse en leucoplasias a nivel de las comisuras y del dorso lingual, zonas que, por otro lado, no suelen estar implicadas en el cáncer oral<sup>(27, 28, 46)</sup>.

En relación al riesgo de malignización de las leucoplasias en el suelo de la boca la hipótesis más generalizada habla de la tendencia de la saliva y de cualquier carcinógeno potencial para acumularse en ese área. También habría que tener en cuenta que la parte inferior de la boca es de origen endodérmico en vez de ectodérmico como la mayor parte del epitelio oral y esta diferencia podría tener alguna connotación en el riesgo de malignización<sup>(47)</sup>.

No se sabe muy bien por qué la ausencia del hábito tabáquico se asocia con un mayor riesgo de transformación maligna. Se especula que en ausencia del tabaco existen otros factores de mayor importancia en el inicio ó la promoción de la carcinogénesis<sup>(38)</sup>.

### **2.2.7.Tratamiento**

En presencia de posibles factores etiológicos se debe esperar un periodo de 2 a 4 semanas para observar la posible regresión de la lesión tras el cese de los mismos, aunque la regresión completa llevará más tiempo. En el caso de que no se observen cambios se procederá a la realización de una biopsia que podrá ser simple-excisional, en pequeñas leucoplasias, incisional, en leucoplasias mayores ó múltiple-incisional en leucoplasias múltiples (“mapeo de campo”)<sup>(27)</sup>.

En relación a su terapéutica, el objetivo primario debe ser prevenir la transformación maligna y los objetivos secundarios lograr la resolución clínica y la modificación histológica<sup>(48)</sup>. Se han descrito varias modalidades de tratamiento entre las que se incluye los cambios en el estilo de vida en relación al consumo de alcohol y tabaco, medicación con retinoides, antimicóticos, escisión quirúrgica, criocirugía y tratamiento con láser, entre otros, no existiendo actualmente consenso en cuanto a cuál de todos ellos es el más apropiado. En este sentido cabe destacar el artículo de Holmstrump y cols., publicado en 2006 donde a partir de un análisis de regresión logística demuestran, tras el análisis retrospectivo de una serie de 254 leucoplasias homogéneas y no homogéneas tratadas o no con cirugía y con un seguimiento de 1,5 a 18,6 años, como las variables que influyeron en la malignización de las lesiones fueron

el tipo clínico de leucoplasia, las no homogéneas presentaron una OR=7 comparadas con las homogéneas, y el tamaño de la lesión, las lesiones con un tamaño superior a 200 mm<sup>2</sup> tienen 5,4 veces más de probabilidad de malignizarse respecto a las de tamaño inferior. Otras variables como el grado de displasia inicial, la localización, el tabaco y el tratamiento o no con cirugía no mostraron significación estadística. En cuanto a que el tratamiento con cirugía no resultara eficaz, los autores comentan que podría ser debido a que la cirugía podría actuar como un estímulo para la promoción del cáncer ó, por otro lado, debido al fenómeno de cancerización de campo<sup>(45)</sup>. Lodi y cols. hacen una revisión sistemática para tratar de analizar cual de los tratamientos de la leucoplasia oral es el más efectivo a la hora de, principalmente, prevenir la malignización. Incluyeron tan sólo 9 estudios en los que ninguno hacía referencia al tratamiento quirúrgico. Concluyen que a pesar de que hay tratamientos que resultan efectivos a la hora de eliminar la lesión, no existe un tratamiento que haya demostrado efectividad a la hora de prevenir la transformación maligna de la leucoplasia o de evitar su recidiva<sup>(48)</sup>.

Se han descrito tasas de recurrencia desde el 0% al 30%. La recurrencia puede estar relacionada con dejar escasos márgenes de seguridad en la extirpación de la lesión, ya que se ha demostrado la existencia de alteraciones nucleares en el epitelio más allá de la leucoplasia clínicamente visible<sup>(27)</sup>. La combinación del análisis histológico y molecular de los márgenes de resección de una leucoplasia permite establecer, con una mayor precisión, el riesgo de recidiva tumoral<sup>(6)</sup>. Cuando la recurrencia acontece en el lugar de la lesión primaria, el término recurrencia queda justificado, independientemente del tiempo que haya transcurrido entre la escisión y la recurrencia. Cuando la recurrencia tiene lugar en otra localización oral debería considerarse a esa lesión como una leucoplasia nueva<sup>(27)</sup>.

Aunque no hay evidencia científica de que el tratamiento, cualquiera que sea la modalidad, realmente prevenga el posible desarrollo futuro de un COCE, una práctica segura parecería ser la de tratar todas las leucoplasias orales, independientemente de la presencia de displasia epitelial<sup>(44)</sup>.

Para adoptar la actitud terapéutica más precisa se han definido dos grupos de riesgo:

1. Grupo de *bajo riesgo de malignización*, formado por aquellas leucoplasias con ausencia de displasia y aquellas que presentan displasia leve y se localizan en áreas

de bajo riesgo ó muestran un espesor menor de 200 mm ó se presentan clínicamente como una leucoplasia homogénea. En este grupo se puede hacer un control periódico del paciente con un intervalo de visitas que no supere los 12 meses, tratar las lesiones con retinoides tópicos u orales, aunque no han dado resultados suficientemente eficaces y tratar las lesiones con técnicas ablativas no quirúrgicas, tales como la crioterapia y la vaporización con láser de CO2.

2. Grupo de *alto riesgo de transformación maligna*, formado por aquellas leucoplasias con displasia leve localizadas en zonas de alto riesgo ó de más de 200 mm de espesor ó asociadas a una forma clínica heterogénea, las leucoplasias con displasia moderada ó grave y las leucoplasias verrugosas. En este grupo está justificado el tratamiento agresivo quirúrgico consistente en la resección de todo el espesor de la mucosa en la que esté presente la leucoplasia.

Dado el alto riesgo de recurrencia postquirúrgica y de desarrollo de cáncer de cabeza y cuello a distancia del foco leucoplásico primario, estos pacientes deben ser seguidos durante el resto de su vida a intervalos regulares que pueden variar de entre 3 a 6 meses en aquellos pacientes considerados de alto riesgo, y de entre 6 a 12 meses en aquellos pacientes considerados de bajo riesgo<sup>(6)</sup>.

### 3. DISPLASIA EPITELIAL

#### 3.1. Definición

Histológicamente las lesiones potencialmente malignas se clasifican según el grado de displasia epitelial. Este concepto hace referencia al conjunto de alteraciones arquitectónicas (estratificación alterada) y celulares (atipias celulares) que sufre el epitelio en el supuesto camino hacia la malignidad, es decir, uno ó más clones de células transformadas re-emplazando lentamente a los queratinocitos normales comenzando desde las capas basales y parabasales para, progresivamente, ir invadiendo toda la altura epitelial<sup>(49)</sup>. En general, la displasia epitelial supone la expresión de un trastorno de maduración en el epitelio oral<sup>(6, 50)</sup>. Se cree que sólo aquellas células con las afectaciones específicas progresarán hacia la malignidad<sup>(51)</sup>.

El concepto de displasia no tiene en cuenta ni la cantidad ni el tipo de queratinización superficial<sup>(50)</sup>. *Ver figura 5*. Las áreas de displasia epitelial a menudo presentan un infiltrado linfocítico crónico en el tejido conjuntivo adyacente, extendiéndose los linfocitos hacia las capas más profundas del epitelio displásico<sup>(17)</sup>.

Alteraciones arquitectónicas	Alteraciones celulares
<ul style="list-style-type: none"><li>. Estratificación epitelial irregular</li><li>. Pérdida de polaridad de las células</li><li>. Hiperplasia de las células basales</li><li>. Profundización y ensanchamiento de los procesos epiteliales en el corion (forma de gota)</li><li>. Aumento en el número de mitosis</li><li>. Mitosis superficiales normales y anormales</li><li>. Queratinización prematura en células individuales (disqueratosis)</li><li>. Perlas córneas en las proyecciones epiteliales intraconjuntivas</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>. Alteración en el tamaño nuclear (anisonucleosis)</li><li>. Alteración en la forma nuclear (pleomorfismo nuclear)</li><li>. Alteración en el tamaño celular (anisocitosis)</li><li>. Alteración en la forma celular (pleomorfismo celular)</li><li>. Incremento de la relación celular núcleo-citoplasma</li><li>. Aumento del tamaño nuclear</li><li>. Figuras mitóticas atípicas</li><li>. Aumento de nucleolos (número y tamaño)</li><li>. Hiperchromasia</li></ul>

**Fig.5. Criterios utilizados para el diagnóstico de displasia.** Modificado de Warnakulasuriya y cols.2008<sup>(50)</sup>.

### 3.2. Clasificación

El término de displasia se ha venido utilizando durante muchos años y ha sido adoptado de nuevo por la Organización Mundial de la Salud en la última versión de la Clasificación de Tumores de la cavidad oral y orofaringe. Por otro lado, han surgido otras clasificaciones histopatológicas tales como la clasificación SIN (squamous intraepithelial neoplasia), que es similar a la clasificación de la WHO pero considera dentro del mismo grupo a la displasia severa y al carcinoma in situ. También ha surgido la clasificación Ljubljana que diferencia lesiones puramente hiperplásicas que no requieren de una extrema vigilancia (hiperplasia simple ó anormal), de grados leves de displasia que requieren seguimiento por posibilidad de transformación en atipia severa, y de atipia severa (carcinoma in situ)<sup>(52)</sup>. La utilidad de esta clasificación se ha demostrado pero su uso no se ha generalizado. Probablemente en un futuro los nuevos descubrimientos en el campo de la biología molecular podrían ser la base para una única clasificación totalmente válida.

La clasificación de WHO en 2005 reconoce 5 estadios histopatológicos en las lesiones precursoras epiteliales:

1. *Hiperplasia escamosa*: suele acontecer en el estrato espinoso (acantosis) y/o en el estrato basal/parabasal (hiperplasia de las células basales); la arquitectura muestra una estratificación normal sin la existencia de atipia celular

2. *Displasia Leve*: en general la alteración arquitectural y la atipia celular quedan limitados al tercio inferior del epitelio.

3. *Displasia moderada*: la alteración arquitectural se extiende hasta el tercio medio, no obstante el grado de atipia celular podría requerir la necesidad de encuadrar la lesión en un grado superior de displasia. De ahí el frecuente solapamiento entre los grados de displasia moderada-severa.

4. *Displasia severa*: la aberración arquitectural a la par que la atipia celular afecta a más de dos tercios del epitelio.

5. *Carcinoma in situ*: se trata de un concepto teórico en el que se indica que ha existido una transformación maligna pero todavía no ha habido invasión hacia el conectivo. Se observa una alteración arquitectural casi completa del epitelio en

conjunción con atipia celular muy pronunciada. Con frecuencia se observan mitosis atípicas y anormalmente superficiales<sup>(24, 27)</sup>.

La displasia epitelial es un precursor relativamente común del cáncer oral. La progresión hacia el cáncer varía ampliamente desde el 6% al 36%<sup>(53)</sup>. El tiempo medio de transformación de una lesión displásica a carcinoma es de 33,6 meses<sup>(54)</sup>.

La displasia oral no se asocia con una apariencia clínica específica, sin embargo la leucoplasia y la eritroplasia son lesiones frecuentemente asociadas con cambios displásicos<sup>(55)</sup>.

### **3.3. Diagnóstico diferencial**

Se debe hacer un diagnóstico diferencial del fenómeno de displasia epitelial con las siguientes entidades:

- El epitelio escamoso reactivo, regenerativo ó reparativo que puede haber sido provocado, entre otras causas, por trauma, inflamación, irradiación y ulceración.
- Lesiones provocadas por la existencia de deficiencias nutricionales por hierro, folatos y vitamina B12<sup>(50)</sup>.

### **3.4. Limitaciones de la displasia epitelial**

Las alteraciones que acontecen en la displasia epitelial son debidas a cambios genéticos que ocurren en el epitelio, aunque es poco probable que las mutaciones observadas sean las mismas que se asocian con la malignización. La displasia severa siempre ha sido considerada como el estadio con más probabilidad de progresión hacia la malignidad, indicando que cuanta más acumulación de mutaciones en el tejido, mayor será la probabilidad de que las mutaciones críticas para la transformación maligna estén presentes. Sin embargo, la malignización puede también surgir del epitelio no-displásico debido a que las mutaciones críticas estén presentes en ausencia de las mutaciones que provocan la displasia<sup>(1, 50)</sup>. De hecho, se ha descrito que la variante sin displasia presenta una incidencia de transformación maligna del 15%, por lo que la presencia de displasia no sería un fenómeno indispensable para que la transformación maligna tuviese lugar. Se ha descrito que un porcentaje variable de leucoplasias orales presentan alteraciones moleculares en común con el COCE, con potencial oncogénico independientemente de la atipia histológica. De hecho, la

aparición de estas alteraciones citogenéticas se ha descrito en leucoplasias sin atipia celular<sup>(6)</sup>.

Otro hecho importante es que se ha observado en algunos casos de carcinoma la existencia de invasión sin haberse visto afectadas las células superficiales<sup>(56)</sup>. Esto indica que los parámetros morfológicos no siempre reflejan con exactitud el proceso de la enfermedad a nivel celular, al menos no en lo que se refiere a las displasias. El criterio histológico que diferencia el cáncer de las lesiones precursoras es la existencia ó no de invasión, para lo cuál se debe observar la interfaz entre el epitelio y la lámina propia. Una interfaz muy irregular con proyecciones celulares puntuales del epitelio, así como la observación en el estrato basal de células parecidas a las del estrato espinoso y la existencia de queratinización individual temprana son signos de malignización<sup>(50)</sup>.

También ha habido dificultad a la hora de diferenciar la displasia epitelial leve de la metaplasia escamosa ó cambios debidos a la reparación epitelial<sup>(57)</sup>.

El problema del examen histopatológico es que da sólo predicciones dentro de un rango relativamente pequeño, lo que le hace un método poco fiable<sup>(47)</sup>. La propuesta de la WHO se basa en una descripción morfológica que no permite reflejar el impacto de la biología celular<sup>(56)</sup>. No existe suficiente conocimiento de la importancia que tienen cada una de las características visuales utilizadas para asignar los grados de displasia epitelial así como la forma en la que interactúan para poder hacer una presunción de riesgo<sup>(33, 58)</sup>.

No existe un consenso claro en relación al sistema de gradación más apropiado para la displasia oral. Algunas displasias leves progresan hacia cáncer mientras que otras de mayor severidad permanecen estables ó incluso involucionan, independientemente de los factores medioambientales<sup>(53)</sup>. Es importante señalar que el grado de una displasia epitelial puede variar con el tiempo. Se ha observado como al suprimir el factor inductor (tabaco), algunas formas leves de displasia epitelial revierten. En otras formas de displasia epitelial más avanzadas, incluso con el control de algún factor responsable, se puede apreciar un enlentecimiento en la tasa de progresión a una forma más grave, pero la reversión completa parece no ser posible<sup>(17)</sup>.



Además existe gran variabilidad inter e intra-observador a la hora de llevar a cabo el diagnóstico histopatológico de la presencia y severidad de displasia<sup>(27, 44)</sup>. La variabilidad inter/intra-observador puede provocar sobre-tratamiento ó infra-tratamiento y aportar diferentes pronósticos para una misma lesión<sup>(59)</sup>. Se ha podido comprobar como la variabilidad aumenta en función de la presencia de inflamación, de la localización de la lesión, menor variabilidad cuando la lesión se encuentra en la mucosa vestibular y en la lengua y mayor variabilidad cuando proceden del labio y la mucosa labial, así como en función de la técnica utilizada para llevar a cabo la biopsia, existiendo menor variabilidad al tomar la biopsia con punch, dada la limitación del campo<sup>(59)</sup>. En relación con los parámetros histológicos se ha obtenido mayor variabilidad inter-observador al hacer la valoración de la estratificación irregular del epitelio, la pérdida de polaridad de las células basales, la variación anormal en el tamaño nuclear, las figuras mitóticas atípicas y el hiperchromatismo<sup>(50)</sup>.

En un intento por hacer más objetivo el diagnóstico de la displasia epitelial, en 1969 Smith & Pindborg elaboraron un atlas con fotografías estándar para el diagnóstico de la leucoplasia, sugiriendo una puntuación por cada tipo de cambio para poder dar más importancia a unos cambios que a otros y obtener un resultado numérico, pero el monográfico era difícil de obtener, estaba cargado de subjetividad y llevaba mucho tiempo realizar el análisis<sup>(50)</sup>. Kramer en 1970 realizó un análisis por ordenador demostrando que las técnicas estereológicas son más precisas y objetivas, pero llevan más tiempo, por lo que lo ideal sería automatizarlas y validarlas. También se habla de la utilización del microscopio electrónico de barrido<sup>(47)</sup>.

Otros autores, en el intento por reducir la variabilidad a la hora de la interpretación de la displasia epitelial, han propuesto la utilización de un sistema binario para su estratificación que comprende el estatus de “bajo grado”, que a su vez incluye las categorías de ausencia de displasia, displasia cuestionable y displasia inicial y el estatus de “alto grado”, que incluye las categorías de displasia moderada y severa<sup>(49, 50)</sup>. Asimismo, se ha recomendado expresar el grado de displasia en las lesiones con leucoplasia junto con la asociación a *Candida* ó al VPH. Siguiendo a Kramer en 1968, este sistema debería tener en cuenta que displasias leves en zonas de riesgo como el suelo de la boca ó la superficie ventral de la lengua, deberían considerarse como de una mayor gravedad y así estratificarse como de alto grado<sup>(43)</sup>.

Otro aspecto importante en el diagnóstico histológico de una biopsia es si la biopsia realizada es realmente representativa del total de la lesión. En este sentido Holmstrup y cols., realizaron un estudio donde comparaban en lesiones premalignas el grado de acuerdo entre el diagnóstico histológico de la biopsia y el diagnóstico histológico de la lesión tras la resección completa de la misma hallando tan sólo un 49% de acuerdo. El 35% del total de las lesiones presentaron un diagnóstico histopatológico más severo incluyendo un 7% de carcinomas inesperados detectados al analizar la lesión completa. Es por esto que estos autores indican hacer revisiones en intervalos cada 3 a 6 meses, independientemente de la presencia ó ausencia de displasia epitelial<sup>(60)</sup>.

Respecto a la posibilidad de que los COCEs surgen también a partir de la mucosa aparentemente normal, como en condiciones normales la mucosa normal no suele investigarse mediante procedimientos invasivos del tipo biopsias, hay autores que proponen validar la utilización de la citología ó biopsia por cepillado para el diagnóstico en poblaciones de alto riesgo<sup>(61)</sup>.

A pesar de todo lo mencionado, la evaluación histopatológica convencional con microscopio óptico de las muestras teñidas con hematoxilina y eosina es todavía el método más válido para diagnosticar el potencial maligno de las lesiones potencialmente malignas, provocando que el sistema de clasificación de la displasia epitelial sea el *gold standard* y actúe como un sistema predictivo<sup>(50, 52)</sup>.

#### **4. MARCADORES MOLECULARES**

Existen diferentes tipos de marcadores celulares y tisulares, que, desde una perspectiva molecular, pueden proporcionar información adicional a la recopilada en el examen clínico y en el estudio histopatológico, ya que, en determinadas situaciones, presentan alteraciones en su expresión o actividad.

Los marcadores moleculares en relación con el cáncer oral se agrupan por familias. Una de las clasificaciones descritas en la siguiente:

1. Marcadores de crecimiento tumoral
2. Marcadores de supresión tumoral y de respuesta antitumoral
3. Marcadores de angiogénesis
4. Marcadores de invasión tumoral y de potencial metastatizante
5. Marcadores celulares de superficie
6. Marcadores intracelulares
7. Marcadores derivados del ácido araquidónico y marcadores enzimáticos <sup>(62)</sup>.

La inclusión de técnicas de biología molecular en el diagnóstico patológico de las biopsias, tanto de lesiones potencialmente malignas como de COCEs, pueden mejorar ostensiblemente la detección de alteraciones invisibles al microscopio. Asimismo, las investigaciones bioquímicas y de biología molecular que definen los marcadores de evolución de las lesiones premalignas y malignas servirán también para evaluar su pronóstico ó la eficacia de los tratamientos<sup>(62)</sup>.

A continuación presentamos unas nociones básicas de los “Antígenos de grupo sanguíneo ABO y Lewis” y de las “Proteínas de Choque Térmico”. Los primeros podrían utilizarse como marcadores celulares de superficie, mientras que los segundos, dado su amplio espectro de funciones podrían utilizarse como marcadores moleculares que quedarían encuadrados en más de una categoría dentro de la clasificación general de los marcadores moleculares.

## **5. ANTÍGENOS DE GRUPO SANGUÍNEO ABO Y LEWIS**

### **5.1. Antígenos de grupo sanguíneo ABO**

#### **5.1.1. Definición**

Un grupo sanguíneo representa la forma de tipificar la sangre en función de la existencia de antígenos específicos en las membranas de los glóbulos rojos y de otras células<sup>(63)</sup>.

A comienzos del siglo XX, el científico austriaco Karl Landsteiner, observó como los eritrocitos de algunos individuos se aglutinaban con el suero de otros individuos y relacionó esto con la existencia de antígenos en los eritrocitos y de anticuerpos en el suero, lo que le supuso el descubrimiento del primer sistema de grupos sanguíneos. La sangre la denominó como grupo A ó grupo B en función del antígeno que expresaran los eritrocitos. Un tercer grupo comprendía eritrocitos que reaccionaban como si carecieran de las propiedades de A y B y fue denominado posteriormente como "O" siguiendo la palabra alemana "*Ohne*", que significa "sin". Al año siguiente se añadió un cuarto grupo sanguíneo, el grupo AB<sup>(63)</sup>.

Tradicionalmente, los antígenos sanguíneos recientemente descubiertos se denominaban alfabéticamente (p.ej. ABO, MNS, P) ó en honor a la primera persona que consiguió crear un anticuerpo contra ellos (p.ej. Duffy, Diego). En 1980, La Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea (ISBT) creó las bases para la estandarización de la terminología de los grupos sanguíneos. Cada antígeno sanguíneo tiene un número y pertenece a un sistema de grupo sanguíneo, una colección ó una serie. Así se define:

*-Grupo sanguíneo:* El sistema de grupo sanguíneo contiene antígenos controlados por un único gen (ó por múltiples *loci* muy relacionados), y el sistema es genéticamente diferente. Existen 22 sistemas de grupo sanguíneo entre los que destacan el sistema sanguíneo ABO, Rh y Kell. A cada grupo sanguíneo se le asigna un dígito de 6 números por parte de la ISBT. Los 3 primeros dígitos representan el grupo sanguíneo (ABO es 001, Rh es 004) y los últimos tres identifican el antígeno según el orden en el que fue descubierto. Para el grupo ABO el antígeno A fue el primero en descubrirse y tiene el número 001.001 mientras que el antígeno B fue el siguiente y se designó como 001.002.

- *Colecciones*: las colecciones contienen antígenos que están relacionados de alguna manera, mediante genética ó bioquímica, pero no cumplen los criterios como para formar parte de un grupo sanguíneo. Una vez que una colección de antígenos se ha demostrado que son genéticamente diferentes, adquieren el estatus de grupo sanguíneo. Existen unas 6 colecciones de antígenos.

-*Series*: los antígenos de las células rojas que no encajan en ningún grupo sanguíneo ó colección se distribuyen en dos series; si su frecuencia es menor del 1% se sitúan en la serie 700 y si su frecuencia es mayor del 90% se sitúan en la serie 901. Existen unos 22 antígenos en la serie 700 y unos 11 en la serie 901<sup>(63, 64)</sup>.

### 5.1.2. Genética

En 1910, se demostró que los antígenos eritrocitarios se transmitían genéticamente y que los antígenos A y B se heredaban de forma codominante sobre O. En 1924 Bernstein describe el “*modelo de los tres alelos*”, aunque no fue hasta 1990 cuando se identificó la secuencia de nucleótidos del gen ABO y en 1995 su organización genómica. Los antígenos de grupo sanguíneo ABO vienen codificados por un *locus* genético, el *locus* ABO, que tiene tres posibilidades alélicas: A, B y O. De cada progenitor se recibe uno de los tres alelos posibles dando lugar a seis genotipos y cuatro tipos sanguíneos (fenotipos). *Ver Figura 6*. Las personas del grupo O son los denominados “donantes universales” ya que su sangre es compatible con todos los tipos ABO. Las personas del grupo AB se conocen como los “receptores universales” ya que pueden recibir sangre de cualquier tipo de grupo sanguíneo.

Hay dos alelos  $A_1$ , el  $A_1$  y la variante  $A_1(A_{1V})$ . Ambos son frecuentes en las poblaciones estudiadas. También encontramos el alelo  $A_2$  que es menos frecuente. Las variantes del grupo sanguíneo B son raras mientras que con respecto al grupo sanguíneo O encontramos 3 alelos:  $O_1$ , la variante  $O_1(O_{1V})$  y el  $O_2$ . Los alelos  $O_1$  y  $O_{1V}$  son frecuentes, en cambio el  $O_2$  es menos común. Se están descubriendo constantemente otros alelos raros. Esto indica el gran polimorfismo en la secuencia codificante del *locus* ABO<sup>(63, 65, 66)</sup>.

Los procedimientos de tipificación de grupos sanguíneos han permitido descubrir un fenotipo raro del grupo sanguíneo ABO denominado *fenotipo Bombay* debido a que el primer paciente identificado así vivía en esa ciudad. En estas personas las células

rojas no presentan antígenos A, B y H y en su suero se observan anticuerpos del tipo IgM que reaccionan con las células rojas de todos los donantes virtuales, incluyendo a los individuos del grupo sanguíneo O. El único donante posible para estas personas sería otro individuo con el *fenotipo Bombay*<sup>(63, 65)</sup>.

Grupo Sanguíneo	Antígeno/s presentes en los eritrocitos	Anticuerpos presentes en el suero	Genotipo/s
A	Antígeno A	Anti-B	AA ó AO
B	Antígeno B	Anti-A	BB ó BO
AB	Antígenos A y B	Ninguno	AB
O	Ninguno	Anti-A y Anti-B	OO

**Fig.6. Esquema de los grupos sanguíneos, antígenos y anticuerpos relacionados con ellos, así como de los posibles genotipos.** Los individuos capaces de construir exclusivamente moléculas A (grupo sanguíneo A) tendrán genotipos AA ó AO, mientras que los individuos del grupo sanguíneo B expresarán los genotipos BB ó BO. Los individuos capaces de expresar tanto el antígeno A como el B (grupo sanguíneo AB) mantienen el genotipo AB. Los individuos del grupo sanguíneo O no expresan ni el antígeno A ni el B, permaneciendo sus antígenos H sin modificar, y son homocigóticos para el alelo nulo(O)(genotipo OO). Modificada<sup>(63)</sup>.

### 5.1.3. Epidemiología

La distribución de los 4 tipos sanguíneos ABO ( A, B, AB, O) varía según las poblaciones en el mundo. Esto viene determinado por la frecuencia de los 3 alelos del gen ABO en las diferentes poblaciones. El tipo O es el más extendido, seguido del grupo A y el grupo B. El grupo AB es el menos común. En 2004 se analizó las frecuencias de los antígenos sanguíneos ABO en los EEUU en función de la raza mediante la obtención de datos de donantes de sangre durante un periodo de 10 años. Los datos obtenidos fueron los que siguen:

- *Tipo sanguíneo O:* Es el tipo más frecuente en las poblaciones del mundo, incluyendo USA y Europa del Oeste. Entre las poblaciones indígenas de América Central y del sur la frecuencia es casi del 100%, también es alta la frecuencia entre los aborígenes Australianos.

- *Tipo sanguíneo A:* es común en Europa Central y del Este. En países como Austria, Dinamarca, Noruega y Suiza, alrededor del 45-50% de la población tienen este

grupo sanguíneo, así como el 40% de los Polacos y Ucranianos. Se han encontrado las más altas frecuencias en poblaciones pequeñas no relacionadas como el 80% de los “Indios Pies negros” en Montana.

- *Tipo sanguíneo B*: relativamente común en China e India, estando presente en el 25% de la población, sin embargo en Europeos ó Americanos de origen europeo sólo se encuentra en el 10%.

- *Tipo AB*: es el menos común. Su frecuencia aumenta en Japón, China y Corea, estando presente en el 10% de la población<sup>(63, 67)</sup>.

#### 5.1.4. Síntesis

Los antígenos ABO no son productos primarios de los genes, sino el resultado de reacciones enzimáticas. La biosíntesis de estas estructuras implica la participación de *glicosiltransferasas* específicas, situadas en el *aparato de Golgi*, que catalizan la adición de monosacáridos a una cadena en crecimiento. El *locus* ABO codifica *glicosiltransferasas* que sintetizan los antígenos A y B en los eritrocitos, para lo cual es necesaria la presencia de un precursor denominado **antígeno H**. El locus H se localiza en el cromosoma 19 en la posición 19q13.3 t contiene 3 exones con más de 5 Kb de ADN genómico. En los eritrocitos, células endoteliales y membranas de las células epiteliales la *fucosiltransferasa* que sintetiza el **antígeno H** viene codificada por el *locus* H (FUT<sub>1</sub>). En las glándulas salivales y en la banda epitelial de la luz de los tractos gastrointestinal, respiratorio y reproductivo, la *fucosiltransferasa* que sintetiza el **antígeno H** viene codificada por el *locus* Se (FUT<sub>2</sub>).

El proceso comienza con la modificación por parte de las  $\alpha$ 1-2 *fucosiltransferasas* de 4 tipos de glicanos precursores, siendo los más frecuentes los tipos I y II. Estas enzimas fabrican el **antígeno H** del grupo sanguíneo que está formado por el disacárido Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1.

Una vez fabricado el antígeno H, los alelos funcionales del *locus* genético ABO codifican la *transferasa A* (glycosil-transferasa  $\alpha$ 1,3-NAcGal-transferasa) y la *transferasa B* ( $\alpha$ 1,3-Gal-transferasa). El *locus* ABO se localiza en el cromosoma 9 concretamente en la posición 9q34.1-q34.2 y contiene 7 exones con más de 18 Kb de ADN genómico, siendo el exón 7 el de mayor tamaño y alberga la mayor parte de la secuencia codificante. El exón 6 contiene la delección que se encuentra en la mayoría de

los alelos O y provoca la pérdida de actividad enzimática. Los alelos A y B se diferencian en 7 sustituciones nucleótidas, 4 de las cuales se traducen en diferentes aminoácidos. Concretamente las *glicosiltransferasas* A y B se diferencian en 4 residuos de aminoácidos, siendo Gly/Ser-235 el más implicado específicamente en el reconocimiento del donante. El alelo O se diferencia del alelo A por una delección de guanina en posición 261. Esta delección hace que se forme una proteína diferente que carece de actividad enzimática y no modificará al precursor H. Las personas que posean ambas *glicosiltransferasas* pertenecerán al grupo sanguíneo AB<sup>(65, 68, 69)</sup>.

La *transferasa A* transfiere un residuo de N-acetilgalactosamina (NAcGal) desde UDP-NAcGal (UDP=uridina-5'-difosfato) al sustrato del precursor H, dando lugar al **antígeno A** definido por el trisacárido  $G\alpha 1NAc-\alpha 1,3$  (Fuc $\alpha 1-2$ ) NAcGal $\beta 1-R$  (R=glicoproteína ó glicolípido, zona de unión de los carbohidratos en la membrana del eritrocito). Similarmente, la *transferasa B* cataliza la transferencia de una molécula de galactosa (Gal) desde UDP-Gal al precursor H produciendo el **antígeno B**. Por lo tanto, las diferencias genótípicas entre A y B son debidas a las pequeñas diferencias por la especificidad del sustrato de las *glicosiltransferasas A* y *B*. Estas enzimas difieren entre sí exclusivamente en 4 de los 354 aminoácidos restantes: Arg/Gly-176, Gly/Ser-235, Leu/Met-266 y Gly/Ala-268. El **fenotipo O** es el resultado de una terminación prematura de la traducción debido a la producción de una *glicosiltransferasa* no activa que provoca la permanencia inalterada del precursor H<sup>(65)</sup>.

Algunos tejidos también sintetizan **formas hidrosolubles** de los antígenos ABO. El epitelio del aparato digestivo, respiratorio, urinario y del aparato de reproducción, expresan oligosacáridos de tipo-1, tal y como ocurre en el epitelio de algunas glándulas salivares y exocrinas. Estos tejidos son los responsables de la síntesis de las formas solubles de los antígenos ABO. Esta capacidad especial por parte de los tejidos secretores viene genéticamente determinada, siendo una función específica de los alelos del *locus Se* que codifican la  $\alpha 1-2$  *fucosiltransferasa*, ya que el *locus H* que codifica la  $\alpha 1-2$  *fucosiltransferasa* no se expresa en estos tejidos. El *locus Se* se localiza en el cromosoma 19 en posición 19q13.3 y contiene 2 exones con 25 Kb de ADN genómico. Estos individuos que secretan el antígeno del grupo sanguíneo O u A/B en saliva reciben el nombre de **secretores**. Por otro lado, los humanos homocigóticos para el alelo nulo en el *locus Se* son incapaces de sintetizar determinantes H en estos tejidos y



no elaboran formas solubles de los determinantes A, B u O en saliva y en otros tejidos, a pesar de que en esos tejidos se continúa sintetizando los precursores solubles utilizados por la  $\alpha$ 1-2 *fucosiltransferasa* codificada por el locus Se. El término de **no secretor** se utiliza para describir el fenotipo de este tipo de personas y se refiere al hecho de que las formas solubles del grupo O, A ó B no pueden detectarse en su saliva. Los secretores han sido clásicamente designados como SeSe ó Sese y los no secretores como *sese*<sup>(65, 70)</sup>. El fenotipo no secretor no es tan raro, encontrándose en el 20% de los Europeos y Norteamericanos<sup>(71)</sup>.

El polimorfismo en los carbohidratos de la superficie celular puede generarse de forma primaria a nivel genético, ya que cada gen codifica una *glicosiltransferasa* específica y genes diferentes son transcritos en los diferentes estadios de diferenciación celular, y también de forma secundaria a nivel epigenético, ya que por ejemplo en relación con la biosíntesis, una determinada estructura no se formará hasta que tanto el carbohidrato, como la enzima y la molécula estén presentes de forma simultánea<sup>(72)</sup>.

#### 5.1.5. Localización

La *membrana de cada célula* roja contiene millones de moléculas de antígenos que son reconocidos por el sistema inmune como propios. Los tipos de antígenos sanguíneos encontrados en dicha membrana pueden ser carbohidratos ó proteínas, teniendo como ejemplo de glúcidos el sistema ABO y el sistema Hh y como ejemplo de proteínas los sistemas Mns, Kell, Rh, Diego, Kidd y Duffy<sup>(63)</sup>.

Los antígenos expresados en la superficie del glóbulo rojo determinan el grupo sanguíneo individual. Aunque los antígenos de grupo sanguíneo ABO son conocidos como antígenos de los eritrocitos, también se expresan en una amplia variedad de tejidos humanos estando presentes en la mayoría de las *células epiteliales y endoteliales*, de ahí que se conozcan con el nombre de antígenos de grupo histo-sanguíneo (*histo-blood group antigens*). Otros ejemplos de antígenos que pertenecen al grupo de antígenos histo-grupo sanguíneo serían los antígenos Lewis, TTn, secretor y P. Cada eritrocito humano expresa alrededor de 2 millones de antígenos de grupo sanguíneo ABO. Otras células sanguíneas como linfocitos T, células B y plaquetas, presentan antígenos de grupo sanguíneo ABO que han sido absorbidos del plasma. Como se ha comentado anteriormente, en los individuos secretores, los antígenos ABO se

encuentran de forma soluble en saliva y en todos los fluidos corporales, a excepción del líquido cerebroespinal<sup>(63, 72, 73)</sup>.

Las glicoproteínas y glicolípidos de la superficie celular son fundamentales a la hora de definir el reconocimiento intercelular y la especificidad antigénica. Asimismo tienen un papel a la hora de regular el ciclo y la replicación celular. Los antígenos del grupo sanguíneo A, B y O se unen a glicolípidos o glicoproteínas y portan sus determinantes antigénicos específicos en el extremo final de la cadena del carbohidrato<sup>(74)</sup>.

En cada célula roja humana aproximadamente de 1 a 2 millones de moléculas de antígenos ABO son expuestos por la proteína de transporte aniónica, conocida también por Band 3. Esto representa el 80% del complejo total de antígenos ABO en las células rojas. Otros  $5 \times 10^5$  antígenos ABO se localizan en la proteína de transporte de glucosa (Band 4.5) de las células rojas. Ambas proteínas integrales de la membrana celular exponen los determinantes ABO con un simple enlace N, unidos a polilactosaminas cuyas ramas terminales pueden exponer múltiples antígenos ABO. Cada célula roja también expresa aproximadamente  $5 \times 10^5$  moléculas de antígenos ABO unidos a glicolípidos. Muchos de estos glicolípidos consisten en polilactosaminas modificadas por la unión a los antígenos A, B y O, unidas a su vez a ceramidas, por lo que también se llaman poliglicosil-ceramidas ó moléculas relacionadas con el subgrupo A<sub>2</sub><sup>(65)</sup>.

#### **5.1.6. Expresión**

La expresión de los antígenos ABH sufrirá cambios durante el desarrollo, la diferenciación, el movimiento y la maduración celular<sup>(68, 72)</sup>.

La mayoría de los estudios en relación con la localización de los antígenos sanguíneos han mostrado que los antígenos sanguíneos tisulares se corresponden con el grupo sanguíneo eritrocitario, pero que la expresión tisular es dependiente del estado de secretor del individuo. Las células epiteliales orales de las personas de grupo sanguíneo O no tienen antígenos A ó B, pero al igual que los eritrocitos, presentarán antígenos H<sup>(72)</sup>.

El conocimiento general en la mucosa oral indica que existen diferencias en la expresión de los carbohidratos de grupo sanguíneo en función del *estadio de diferenciación*. Las células basales expresan carbohidratos cortos y libres, mientras que

en el resto de los estratos epiteliales se expresan carbohidratos de mayor longitud, expresando las células parabasales estructuras de carbohidratos más cortas que las expresadas por las células espinosas, las cuales a su vez son más cortas que las expresadas en el estrato superficial del epitelio. Por otro lado, se sabe que la población celular del estrato basal es heterogénea y puede dividirse en dos compartimentos. Un compartimento expresa carbohidratos cortos que finalizan en ácido siálico, mientras que el segundo compartimento expresa carbohidratos más largos y sin ácido siálico, más parecido a lo observado en las células parabasales. El primer compartimento se localiza en la punta de los *rete pegs* (proyecciones epiteliales), siendo el compartimento con mayor proliferación celular, mientras que el segundo compartimento comprende las células basales adyacentes a las papilas conectivas y con un índice de proliferación bajo. Todo esto hace pensar en la existencia de una buena correlación entre la estructura ó composición de los carbohidratos de superficie celular y el ritmo de proliferación celular. Se ha demostrado una elongación de los carbohidratos a medida que avanza la diferenciación celular ó la vida media de la célula. Lo curioso es que en algunas especies animales como ratón, rata y algunos monos, se da una patrón de expresión opuesto a lo observado en humanos ya que existe una reducción en la longitud de los carbohidratos a medida que progresa la diferenciación terminal<sup>(72)</sup>.

#### **5.1.7. Funciones**

La membrana que delimita la extensión de la célula no es simplemente una envoltura física, sino que tiene varias funciones específicas como la capacidad de reaccionar con otras células y con la matriz intracelular<sup>(75)</sup>. Los carbohidratos, entre los que se encuentran los antígenos sanguíneos, son estructuras localizadas en la superficie celular, unidos a lípidos o proteínas embebidas en la membrana. Estos carbohidratos tienen un gran potencial para servir como *moléculas de información*. Los monosacáridos pueden estar unidos por uniones glicosídicas diferentes y formando variadas secuencias, creando así, una gran complejidad en las amplias cadenas de oligosacáridos. Dichas cadenas difieren de las cadenas peptídicas en que en estas últimas, los aminoácidos que las componen, sólo tienen un lugar de unión con la unidad monomérica adyacente, en cambio, cada monosacárido tiene 3 ó 4 lugares diferentes que pueden ser sustituidos por el siguiente azúcar<sup>(76)</sup>.

Las funciones de los oligosacáridos del grupo sanguíneo ABO no se conocen. El hecho de que los individuos con fenotipo Bombay no presentan ninguna connotación patológica hace pensar que las funciones de los antígenos A, B y O, que probablemente han existido tempranamente en la evolución, carecen de relevancia. Se ha sugerido que el polimorfismo genético del locus ABO pudiera proporcionar una ventaja selectiva para la protección frente a determinados agentes infecciosos en la era prehistórica, pero no hay evidencia notable disponible que apoye esta idea<sup>(77)</sup>.

Dado que los carbohidratos localizados en la superficie celular y en la matriz extracelular juegan un papel importante en el reconocimiento celular y en la organización de los tejidos y órganos, su expresión aberrante se relaciona íntimamente con determinadas enfermedades y neoplasias<sup>(73)</sup>.

Varios estudios han demostrado que los carbohidratos de la superficie celular están implicados en las interacciones célula-célula así como célula-sustrato, por lo que cualquier cambio en la superficie celular de dichos carbohidratos provocaría un cambio en el comportamiento celular<sup>(72)</sup>. Los antígenos sanguíneos pueden estar presentes en receptores clave controlando la proliferación, adhesión y motilidad como se ha detectado en el receptor del factor de crecimiento epidérmico, en integrinas, cadherinas y en CD-44<sup>(68)</sup>. En este sentido se ha visto la implicación del antígeno H en la adhesión del blastocito al epitelio uterino, asumiendo un importante papel en las reacciones intercelulares<sup>(72)</sup>.

Se han encontrado asociaciones entre el fenotipo del grupo ABO y el riesgo relativo de padecer una serie de enfermedades. En este sentido, destaca la relación existente entre el fenotipo ABO individual y los niveles plasmáticos del Factor de von Willebrand, glicoproteína implicada en la hemostasia. La presencia de los antígenos sanguíneos en este factor puede causar problemas en el tratamiento de la *hemofilia*<sup>(78)</sup>.

Se ha establecido una mayor asociación entre el riesgo de infarto de miocardio<sup>(79)</sup>, mayor prevalencia de obesidad<sup>(80)</sup> y mayor mortalidad por cáncer de pulmón<sup>(81)</sup>, en varones de fenotipo O, con exposición a largo plazo a determinados factores de riesgo como contaminantes medioambientales, comparados con individuos de otros grupos sanguíneos. En relación con el cáncer de ovario y tumores ováricos benignos<sup>(82)</sup> y el cáncer de glándulas salivares y tumores benignos en estas glándulas<sup>(83)</sup>,

se detectó que pertenecer al grupo A supuso un mayor riesgo de desarrollar estos cánceres y tumores benignos, especialmente ante determinados tipos histológicos.

También se ha demostrado la participación de los carbohidratos en las interacciones entre las células y el medioambiente que las rodea. En este sentido se ha comprobado que la adhesión de microorganismos a las superficies mucosas se ve mediada en algunos casos por interacciones entre los carbohidratos de la superficie celular y las proteínas de la superficie bacteriana ó vírica. El patrón de expresión de los carbohidratos en las células epiteliales determinará el lugar de predilección para la adhesión inicial, la colonización y la naturaleza de la infección<sup>(72)</sup>. Experimentos *in vitro* demuestran que los antígenos del grupo sanguíneo humano B tienen roles muy importantes en la *adhesión intercelular* dependiente del calcio en células embrionarias de rana. También se ha demostrado que la glicosilación del grupo sanguíneo A de los receptores de integrinas se relaciona con la movilidad por contacto y la proliferación de células tumorales. Se ha visto asociación entre la *infección del tracto urinario* y mujeres no secretoras y en casos de *úlceras peptídicas* y no secretoras. Estas asociaciones podrían deberse a interacciones adhesivas entre las moléculas del grupo sanguíneo expresadas por el epitelio y los patógenos bacterianos que utilizan dichas moléculas para ocasionar una invasión epitelial<sup>(78)</sup>.

Por otro lado, existen enfermedades que pueden alterar el fenotipo ABO de una persona mediante la transformación de un antígeno de un tipo en otro como en el caso de las infecciones necrotizantes, ó perder antígenos de grupo ABO como en el caso de enfermedades que aumentan la demanda de eritrocitos, ó cánceres hematológicos que pueden alterar las cadenas de azúcares en los antígenos sanguíneos<sup>(63)</sup>.

## 5.2. Antígenos de grupo sanguíneo Lewis

### 5.2.1. Definición

Dentro del sistema de grupo sanguíneo humano encontramos el sistema antigénico Lewis que consiste en un set de  $\alpha$ 1-3-glicanos fucosilados similares estructuralmente. El término Lewis hace referencia al nombre de familia de H.G.D. Lewis, primera mujer en la que se descubrió por primera vez el antígeno *Lewis a*. La primera descripción de un anticuerpo del sistema Lewis fue publicada en 1946 por A.E. Mourant. Las principales formas antigénicas de los antígenos del grupo Lewis son los antígenos *Lewis a*, *Le<sup>a</sup>*, *Lewis b*, *Le<sup>b</sup>*, *Lewis x*, *Le<sup>x</sup>* y *Lewis y*, *Le<sup>y</sup>*. También existen formas sialadas o sulfatadas de los determinantes *Le<sup>a</sup>* y *Le<sup>x</sup>*, *sialil-Le<sup>a</sup>* y *sialil-Le<sup>x</sup>* <sup>(65, 77)</sup>.

Los antígenos del grupo Lewis están estructuralmente relacionados con los antígenos del sistema ABO. Se fabrican por la adición secuencial de monosacáridos específicos en las partes terminales de las cadenas precursoras de glúcidos en glicolípidos y glicoproteínas<sup>(65)</sup>.

### 5.2.2. Genética, síntesis y epidemiología

Los genes relacionados con el sistema del grupo sanguíneo Lewis se encuentran en el cromosoma 19p13.3. La síntesis de los epítomos depende de la interacción de dos *fucosiltransferasas* diferentes, productos de dos *loci* distintos: FUT<sub>2</sub> o el locus secretor (Se) del sistema de grupo sanguíneo ABO, es dominante y codifica la  $\alpha$ -1,2-*fucosiltransferasa* (FUT<sub>2</sub>) y el locus FUT<sub>3</sub> que codifica la  $\alpha$ -1/3,1/4-*fucosiltransferasa* (FUT<sub>3</sub>). Los productos oligosacáridos finales son el resultado de la acción de estas enzimas sobre los sustratos de los mismos precursores H de los antígenos ABO, de tal forma que los antígenos *Le<sup>a</sup>* y *Le<sup>b</sup>* son productos de los sustratos de tipo-1, mientras que *Le<sup>x</sup>* y *Le<sup>y</sup>* son los productos equivalentes cuando los sustratos son de tipo-2.

Así, *Le<sup>a</sup>* resulta de la adición por parte de FUT<sub>3</sub> de una fucosa mediante enlace  $\alpha$ -1-4 a la GlcNAc del sustrato precursor insustituible que no puede ser nuevamente fucosilado y constituye el principal antígeno encontrado en los individuos **no secretores** cuyo fenotipo Lewis será por tanto Le(a+b-). Si el paciente es **secretor**, el gen Se activa al gen H y la enzima FUT<sub>3</sub> que hace que se añada un azúcar adicional al antígeno *Le<sup>a</sup>*, convirtiéndole en el antígeno *Le<sup>b</sup>*. Tanto los antígenos *Le<sup>a</sup>* como *Le<sup>b</sup>* están en el plasma

de los individuos secretores, pero será el antígeno  $Le^b$  el que preferentemente se adsorba en el eritrocito, adquiriendo el paciente el fenotipo (a-b+)<sup>(65)</sup>.

Por tanto, la codificación del sistema Lewis es dependiente del *gen Le*, pero la producción en un órgano cualquiera está bajo el control del *gen Se*<sup>(84)</sup>. Sin embargo, se ha visto que en individuos no secretores también se puede secretar *le b*, por lo que en estos casos podría estar actuando una *fucosiltransferasa* diferente, proviniendo, por ejemplo, del gen H. Esto hace que, a diferencia del sistema ABO, no exista una correspondencia directa entre el estatus Lewis a nivel eritrocitario y el estatus Lewis a nivel tisular<sup>(72)</sup>.

Los tres principales fenotipos son  $Le(a+b-)$ ,  $Le(a-b+)$  y  $Le(a-b-)$  resultado de la interacción de los genes Lewis y secretor. Si el gen Lewis está presente los posibles fenotipos son  $Le(a+b-)$  ó  $Le(a-b+)$ , sin embargo, si no existe gen Lewis el genotipo será  $Le(a-b-)$ . Un fenotipo  $Le(a+b+)$  aparecerá en individuos en los que la expresión del precursor tipo-H está disminuida debido a una mutación en el gen FUT<sub>2</sub> (385 A>T) ó por una fucosilación incompleta del dicho precursor<sup>(77)</sup>. El genotipo  $Le(a+b+)$  es raro en la raza Caucásica y Negra y frecuente en la población Oriental. En los individuos que son homocigóticos para los alelos nulos en el gen Lewis pueden darse dos situaciones, un fallo en la expresión de FUT<sub>3</sub> resultará en un fenotipo Lewis nulo ( $Le(a-b-)$ ), son positivos para el estado secretor y se construyen los determinantes de tipo-1, pero estas estructuras permanecen sin ser transformadas en determinantes  $Le^b$ , y en los individuos Lewis nulo no secretores, los precursores de tipo-1 no son sustituidos por las fucosiltransferasas Lewis o secretoras dando lugar a la ausencia de  $Le^a$ ,  $Le^b$  y estructuras H con un fenotipo  $Le(a-b-)$ . El fenotipo nulo también podría deberse a la ausencia de glicolípidos de Lewis de la membrana, como podría ocurrir en pacientes con determinados cánceres u otras enfermedades<sup>(65)</sup>. En la raza Negra el genotipo  $Le(a-b-)$  ocurre con una frecuencia del 20-25% comparado con una frecuencia del 5% en Caucásicos. Por otro lado los recién nacidos serán  $Le(a-b-)$  a pesar de su genética, ya que las células no han tenido el tiempo suficiente para absorber los antígenos Lewis del plasma<sup>(77)</sup>.

El antígeno  $Le^y$  es equivalente al  $Le^b$ , de tal forma que los individuos con genotipo *sese* no pueden producir  $Le^y$ . El antígeno  $Le^x$  se produce en individuos con el gen Se que provoca que la  $\alpha$ -3-L-fucosiltransferasa transfiera  $\alpha$ - fucosa, al N-acetyl

glucosamina subterminal del precursor H de tipo 2<sup>(84)</sup>. En general, los individuos secretadores expresarán Le<sup>b</sup> y Le<sup>y</sup> y los no secretadores no expresarán tales antígenos pero sí los antígenos Le<sup>a</sup> y Le<sup>x</sup>.

### 5.2.3. Localización

Los antígenos de grupo Lewis residen en la superficie de los eritrocitos en los glicolípidos, encontrándose de 4500 a 7300 moléculas de Le<sup>a</sup> por célula, pero a diferencia de los otros grupos sanguíneos, la síntesis no ocurre en los eritrocitos. Los glicoesfingolípidos que transportan los epítomos antígenicos Le<sup>a</sup> ó Le<sup>b</sup> circulan en el plasma unidos a lipoproteínas plasmáticas o en forma de dispersiones acuosas y son adsorbidos por el eritrocito mediante un proceso de adsorción pasiva. Por este motivo normalmente no son detectados en los eritrocitos de los recién nacidos y sí aparecen a nivel adulto a la edad de dos años<sup>(65, 77)</sup>. Los anticuerpos suelen darse en pacientes con genotipos *le (a-b-)*, son del tipo IgM y no atraviesan la placenta, de ahí que no hayan provocado muchos problemas en relación con enfermedades hemorrágicas en el recién nacido<sup>(77)</sup>.

La síntesis de los glicanos de Lewis ocurre predominantemente en las células epiteliales exocrinas, sobretodo de origen endodérmico. La principal, pero no exclusiva, zona de síntesis de los glicolípidos Lewis del plasma, es el tracto digestivo. Aquí, las células mucosas albergan estos antígenos en el lumen intestinal, donde son digeridos, reabsorbidos y transportados al plasma donde pueden ser adquiridos por eritrocitos, linfocitos y plaquetas. También se expresan en el colon y en el páncreas. Los antígenos relacionados con Lewis pueden encontrarse como oligosacáridos libres en la leche y orina o bien unidos a proteínas en una gran variedad de tejidos<sup>(77, 85)</sup>.

### 5.2.4. Funciones y expresión

La función de los antígenos Le *a* ó Le *b* no está clara, pero aparentemente no existen consecuencias patológicas en los individuos con fenotipo Lewis nulo.

Se ha observado que el antígeno Le<sup>b</sup> podría ser un receptor de la bacteria *Helicobacter pylori*, agente causal de la *gastritis crónica*, permitiendo su adhesión a la mucosa gástrica, con la complicación de que no solo se trataría de un proceso simple de



adhesión, sino que algunas especies de *Helicobacter pylori* podrían por sí mismas elaborar antígenos  $Le^{b(77)}$ . Asimismo los antígenos  $Le^x$  y  $Le^y$  tienen roles importantes en los *fenómenos de adhesión* durante el desarrollo y en los tejidos adultos. Las formas sialadas  $Le^x$  y  $Le^a$  son receptores conocidos de la E-selectina siendo importantes en la *reclutación linfocítica*. En embriones de ratones se ha podido comprobar el papel activo de  $Le^x$  en la adhesión celular dependiente de calcio<sup>(65, 77, 86)</sup>.

Por otro lado, los antígenos Lewis están ausentes en los pacientes que padecen el síndrome de adhesión leucocitaria deficiente tipo I y tipo II<sup>(87)</sup>, pudiendo esto tener sugerir implicación biológica de los mismos en tales síndromes.

## 6. PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

### 6.1. Definición y nomenclatura

Las proteínas de choque térmico, del inglés *Heat shock proteins (Hsps)*, ó proteínas antiestrés, constituyen uno de los grupos de proteínas más conservado a lo largo de la evolución, cumpliendo un papel similar en todos los organismos. Su ubicuidad ha hecho que en un primer momento se las agrupara bajo el nombre genérico de ubiquitinas. Su descubrimiento tuvo lugar en 1962 y desde que en 1975 se comprobó el aumento de síntesis de estas proteínas inmediatamente tras someter a las células de *Drosophila* a un choque térmico, se han ido detectando en todos los organismos examinados incluyendo procariotas, hongos, y plantas, así como en los grandes eucariotas, por lo que se piensa que deben jugar un papel muy importante en la biología celular. Su nombre hace referencia a que su síntesis se induce en respuesta al calor térmico, aunque, en situaciones de temperatura normal las *Hsps* también se encuentran presentes en los organismos ejerciendo roles vitales en las funciones celulares como regulación del ciclo celular, desarrollo embrionario, diferenciación celular y estimulación hormonal, entre otros <sup>(88-90)</sup>.

Siguiendo la nomenclatura del *Cold Spring Harbor Meeting* de 1996, los nombres de las familias se escriben en letras mayúsculas, p.ej. HSP70, mientras que los miembros de una familia se escriben como Hsps, p.ej. Hsp70<sup>(91)</sup>. La *Figura 7* muestra la última nomenclatura propuesta en relación con algunas de las principales Hsps.

NOMBRE ANTIGUO	NOMBRE NUEVO
Small heat shock proteins	HSPB
HSP27	HSPB1
HSP60	HSPD1
HSP70	HSPA
HSP90	HSPC

**Fig.7. Nueva nomenclatura de las Hsps.** Modificada de Kampinga y cols. Está basada en los símbolos genéticos sistemáticos utilizados por el comité de Nomenclatura Génica que se usan como los identificadores primarios en las bases de datos <sup>(92)</sup>.

La mayor parte de los datos obtenidos con las *Hsps* provienen de mediciones cristalográficas con rayos-x y de experimentos físico-químicos mediante los cuales se clonan los genes, se determinan las secuencias primarias de las proteínas y se comprueban los factores reguladores de su inducción<sup>(89)</sup>.

## **6.2. Expresión de las Hsps**

La respuesta al estímulo térmico mediante *Hsps* es una respuesta universal genéticamente muy conservada en todos los organismos y con mínimas variaciones entre especies<sup>(88)</sup>. La respuesta al estrés mediante las *Hsps* tiene como principal objetivo minimizar los daños producidos por el estrés mediante el potenciamiento de la capacidad de la célula para afrontar el aumento en la concentración de proteínas no ensambladas ó desnaturalizadas<sup>(93)</sup>. Cuando el factor causante del estrés es eliminado del medio ambiente, las células continúan normalmente con su metabolismo. En cambio, si el estrés aumenta, la función protectora de las *Hsps* se ve sobrepasada, deteniéndose su producción y activándose el programa de apoptosis<sup>(94)</sup>. A parte del estrés medioambiental que supone el choque térmico, las *Hsps* también pueden activarse a partir de otros estímulos medioambientales como la radiación ultravioleta, el etanol, ciertos iones metálicos pesados u oxidantes, y a partir, también, de ciertas situaciones estresantes fisiológicas como infección, inflamación ó isquemia, ejerciendo en todos estos casos y en el caso del aumento de temperatura, un papel protector frente a los posibles efectos tóxicos de estos estímulos<sup>(88, 89)</sup>. Se trata de una respuesta rápida e intensa, de emergencia<sup>(88)</sup>. La temperatura necesaria para su activación depende del medioambiente en el que se esté desarrollando el organismo<sup>(88)</sup>.

Las *Hsps* basales son sintetizadas de forma constitutiva por la célula en situaciones no estresantes dependiendo del ciclo celular, del estatus hormonal y de la diferenciación<sup>(95)</sup>.

## **6.3. Clasificación**

Las principales clases de *Hsps* incluyen la familia de las pequeñas *Hsps*, y las familias HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 y HSP110<sup>(96)</sup>. Cada familia de *Hsps* se compone de miembros que, localizados en diferentes compartimentos celulares, bien se expresan constitutivamente ó cuya inducción está regulada. Por ejemplo, la HSP90 se

expresa en las células abundantemente de forma constitutiva, sin embargo la HSP70 y la HSP27 se inducen fuertemente ante diferentes situaciones de estrés<sup>(90)</sup>.

A continuación vamos a explicar las características más destacadas de las *Hsps* más importantes:

### 1. Familia de las pequeñas *Hsps*:

Existe un grupo de *Hsps* de bajo peso molecular (12-43 kDa) que, a pesar de tener secuencias genéticas diferentes, comparten propiedades estructurales, tales como la capacidad para formar grandes estructuras poliméricas, los *heat shock granules* a partir del ensamblaje de otros polipéptidos, aunque las pequeñas *Hsps* no formarán parte de la estructura final. Su expresión se induce por las temperaturas elevadas. De hecho parecen tener, de entre todas las *Hsps*, el papel más claro en el fenómeno de la *termotolerancia*. Otros estímulos que inducen su expresión son el shock frío y la presencia de estrógenos, isquemia, ésteres, hormonas, ceramidas, prostaglandinas, antibióticos y fármacos quimioterapéuticos. En su estructura se distingue un dominio de 80-100 aminoácidos altamente conservado denominado “dominio de las  $\alpha$ -cristalinas”. Basándose en la estructura molecular se han identificado 10 pequeñas *Hsps* en mamíferos: HspB1/ Hsp27, HspB2/MKBP, HspB3/hspL27, HspB4/  $\alpha$ -A cristalina, HspB5/  $\alpha$ -B cristalina, HspB6/Hsp-20/p20, HspB7/cvHsp, HspB8/hsp-22, HspB9, HspB10/ODF1. Recientemente se ha relacionado estructuralmente con las pequeñas *Hsps* a la proteína HspB1-10. Algunos autores también considerarían dentro del grupo a la Hsp10 mitocondrial y a la HO-1/hsp-32 citoplasmática basándose en su estructura molecular y en su actividad como chaperonas, aunque, por otro lado, estas proteínas no contienen el “dominio de las  $\alpha$ -cristalinas”<sup>(88, 97)</sup>.

La ***Hsp27*** (ó HspB1) es una proteína citoplásmica de 27-kDa ampliamente expresada de forma constitutiva en diversos tejidos, destacando su expresión citoplasmática y nuclear en tejidos especialmente sensibles a la estimulación por estrógeno como útero, oviducto, vagina y piel, habiéndose observado cambios significativos en su localización y cuantificación, durante las diferentes fases del ciclo menstrual<sup>(97, 98)</sup>. Tras su inducción, la proteína se fosforila y simultáneamente se ve traslocada desde el citoplasma a la periferia ó alrededor del núcleo<sup>(99)</sup>. El proceso de fosforilación es clave en la regulación de las funciones de la *Hsp27*, viene inducida por diversos estímulos extracelulares y contribuye a la organización estructural de la

proteína<sup>(100)</sup>. Concretamente, dicha fosforilación acontece en los residuos de serina 78 y 82 gracias a una kinasa específica activada por diversos mecanismos de transducción de señales<sup>(101)</sup>. Entre sus funciones encontramos la participación en enfermedades neurodegenerativas<sup>(102)</sup>, su actividad en la dinámica del citoesqueleto promoviendo la polimerización de los filamentos de actina que es dependiente de su fosforilación a partir de la activación de la proteína activadora de mitosis (MAP) p38<sup>(103)</sup> y su participación en la expresión de genes pro-inflamatorios<sup>(104)</sup>, junto con su función compartida con el resto de las *Hsps* de protección frente a diversos estímulos estresantes. Para llevar a cabo esta función no es necesaria su translocación al núcleo ni su disociación de los complejos multiméricos<sup>(105)</sup>.

Las HspB2/MKBP, HspB3/hspL27, HspB5/  $\alpha$ -B cristalina, HspB6/Hsp-20/p20, HspB7/cvHsp, HspB8/Hsp-22 se expresan notoriamente en músculo. Las  $\alpha$ -A/B cristalinas se han relacionado tradicionalmente con su expresión en el ojo, pero también se han detectado en riñón y cerebro, entre otros. La HspB9 es una proteína testicular y la HspB10/ODF1 es específica de la superficie externa del esperma<sup>(97)</sup>.

## 2. Familia de la HSP60:

La familia HSP60 en mamíferos está formada por la *Hsp60* mitocondrial (mt-Hsp60) y la *Hsp60* citosólica (polipéptido 1-complejo-T). La mt-Hsp60 existe equilibradamente en forma de monómero, heptámero y tetradecámero y a bajas concentraciones se disocia en monómeros y en presencia de mt-Hsp10, el co-factor de mt-Hsp60, se agrega en tetradecámeros<sup>(96)</sup>.

En contraste con la *Hsp70*, dedicada al desdoblamiento y desensamblaje de las proteínas, la hsp60 participa en el plegamiento y ensamblaje de las mismas, así como a la translocación de las mismas a través de membranas, de ahí su denominación como chaperoninas<sup>(88, 89)</sup>.

## 3. Familia de la HSP70:

La *Hsp70* es la más conservada en la evolución, siendo constitutiva y participando en los procesos de maduración de otras proteínas celulares, transporte de las mismas, eliminación de proteínas desnaturalizadas y actividad de ATPasa. En su estructura distinguimos dos dominios fundamentales, una porción compacta amino-

terminal, de 45 kDa, altamente conservada que contiene una zona de unión para el ATP, con actividad ATPasa débil, y una zona de unión para la calmodulina de 15-18 kDa y otro dominio de 10 kDa compuesto por una región carboxilo más variable e importante para la unión a proteínas cuya función se desconoce. La molécula nativa es un dímero pero forma complejos oligoméricos al unirse a otras sustancias<sup>(89, 93, 96)</sup>.

La *hsp70* tiene gran afinidad para unirse al ATP lo que le permite fijarse a proteínas y disociar complejos proteicos como vesículas cubiertas de clatrina, proteínas nucleolares y cadenas pesadas de Inmunoglobulina G formadas en ausencia de las cadenas ligeras (en este caso la *hsp70* se denomina BiP), entre otros, y tienen un papel fundamental para crecer en altas temperaturas o en todas las temperaturas indicando su función fundamental en la fisiología celular normal.

La *Figura 8* presenta los miembros de la familia HSP70 humanas conocidas hasta la fecha y las principales características de su regulación utilizando la nomenclatura propuesta por B.Watowich y R.Morimoto<sup>(88)</sup>.

Nombre de la proteína	Regulación
<b>hsp70</b>	Es la proteína más inducida por calor, regulada por el ciclo celular. Tiene expresión basal.
<b>hsp72</b>	Inducida por calor, no tiene expresión basal.
<b>p72</b>	Ligeramente inducida por calor, alta expresión basal.
<b>grp78</b>	No inducida por calor y sí inducida por falta de glucosa, ionóforos de calcio, inhibidores de la glicosilación...

**Fig.8. Hsps humanas pertenecientes a la familia HSP70.** Modificado de Lindquist & Craig<sup>(88)</sup>.

El gen de la *Hsp70* se expresa de forma constitutiva en la interfase G1/S y en la fase S del ciclo celular<sup>(106)</sup>.

En estudios *in vitro* se ha comprobado que tras el choque térmico, tanto *p72* como *Hsp70* migran hacia el núcleo y se asocian al nucleolo, que es una estructura muy sensible a la hipertermia, en principio, para ejercer una función protectora en el mismo mediante la probable unión a proteínas parcialmente ensambladas y a cromatina no condensada previniendo su desnaturalización irreversible<sup>(88, 89)</sup>.

La regulación de *Hsp70* en función del ciclo celular sugiere un papel de la proteína en el control del crecimiento celular<sup>(88)</sup>.

Se ha podido detectar el papel de *Hsp70* a la hora de importar varias proteínas en otras organelas celulares como el retículo endoplásmico, cloroplasto y lisosomas. En este caso la *Hsp70* desdobra la proteína ensamblada para que pueda introducirse a través de los poros de las membranas. Otros miembros de la familia HSP70 actúan en el interior de las organelas<sup>(89)</sup>.

Varios miembros de la familia HSP70 están implicados en el procesamiento y presentación antigénica mediante la unión a péptidos cortos provocando una respuesta inmune antitumoral potente<sup>(107)</sup>. Estudios sobre la estructura de *Hsp70* han sugerido la presencia de un surco de unión a proteínas que recuerda al observado en el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC)<sup>(108)</sup>.

#### 4. Familia de la HSP90:

La familia de la HSP90 incluye la *Hsp90* citosólica ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y la forma en el retículo endoplásmico, la *gp96(grp94)*<sup>(96)</sup>.

Dentro de las células eucariotas la *Hsp90* se encuentra en abundancia en las células normales, muy fosforilada con serinas y treoninas y se localiza en el citoplasma celular. Una pequeña fracción de la misma se transloca hacia el núcleo tras el choque térmico<sup>(89)</sup>.

La *Hsp90* es una proteína conformacionalmente flexible que se asocia con un grupo de variadas co-chaperonas dependiendo de la ocupación por ATP ó ADP de una porción amino-terminal en su estructura<sup>(109)</sup>. Se ha detectado la asociación de *Hsp90* con diferentes proteínas tipo tirosín-kinasa ejerciendo, probablemente, una función de transporte. Otra de las asociaciones vislumbradas ha sido la de la *Hsp90* y el complejo receptor de las hormonas esteroideas, manteniendo la *Hsp90* con su presencia inactivo al receptor hasta que sea la hormona la que mande la señal de activación para romper esta asociación y producirse la activación del receptor. De igual forma se ha podido detectar la asociación de *Hsp90* con proteínas del citoesqueleto, actina y tubulina, en respuesta al estrés térmico<sup>(88, 89)</sup>.

#### 6.4. Funciones

Tradicionalmente se ha considerado a las *Hsps* como moléculas intracelulares, sin embargo, tras la muerte celular por necrosis, no por apoptosis, o ante determinadas situaciones estresantes, las *Hsps* son liberadas a compartimentos extracelulares<sup>(96)</sup>. Así, presentan una doble función, una función intracelular citoprotectora/antiapoptótica y una función extracelular inmunogénica<sup>(90)</sup>.

Se ha podido comprobar su papel en los fenómenos inmunitarios con una capacidad para inducir citoquinas pro-inflamatorias, para activar y hacer madurar a las células dendríticas y con un posible papel como propias citoquinas, sirviendo de “señal de peligro” en el lugar de la herida<sup>(96)</sup>. También ha quedado demostrada la apetencia de los anticuerpos y de los linfocitos T por las *Hsps* de diversos microorganismos. Estos microorganismos sufren un choque térmico cuando invaden al hospedador provocándose la liberación de las *Hsps*. Por otro lado, el hospedador también liberará estas proteínas tras la situación estresante que supone la invasión microbiana. Los anticuerpos y los linfocitos T detectarán los epítomos de estas proteínas en los microorganismos y los destruirán, limitando así la extensión de la infección. Dado que en el propio hospedador no infectado también existen *Hsps* podría pensarse en el riesgo de fenómenos de autoinmunidad. No obstante, en las células normales, las *Hsps* se encuentran en unos niveles muy bajos y localizadas en el interior de la célula. El estrés aumentará sus niveles y se desplazarán a otros compartimentos celulares como la superficie celular<sup>(89)</sup>. Varios autores han demostrado asociación entre *Hsps* y receptores específicos de los linfocitos, en concreto con el receptor  $T\gamma\delta$ , suponiendo las células  $T\gamma\delta$  del 1% al 2% de las células T en sangre ó tejido linfoide, y se piensa en la posible participación de los mismos en las reacciones inmunes frente a las *Hsps* autólogas<sup>(110, 111)</sup>. Asimismo se ha visto que la capacidad antigénica de las *Hsps* no reside en ellas mismas, sino en los péptidos a los que se asocian lo que supone avances en los estudios inmunoterapéuticos para, por ejemplo, el tratamiento del cáncer oral<sup>(107, 112)</sup>.

La función protectora de las *Hsps* guarda íntima relación con el fenómeno de la *termotolerancia*. En estudios experimentales se comprobó como un grupo de organismos se destruye rápidamente cuando se aumenta bruscamente su temperatura de crecimiento a una temperatura mucho mayor. Sin embargo, si este aumento de temperatura es más progresivo, se inducen las *Hsps* y la destrucción es más lenta. En



este sentido se ha detectado como, ante fenómenos de estrés moderado, no necesariamente letal, ha habido una inducción de *Hsps* con el fin de proteger al organismo de estímulos estresantes mayores. La mayoría de los estudios apoyan la hipótesis de que las *Hsps* son componentes importantes en la inducción a la *termotolerancia*, pero, en varios estudios se ha constatado que su síntesis no es suficiente para aportar *termotolerancia* y, en otros, que no parecería ser necesario<sup>(88)</sup>.

Dada sus funciones de transporte y de inactivación de receptores se las ha considerado como chaperonas moleculares ó acompañantes moleculares que reconocen y se unen a cadenas nacientes de polipéptidos y las estabilizan antes de su ensamblaje en complejos multimoleculares y a proteínas intermedias parcialmente ensambladas, previniendo su agregación y ensamblaje defectuoso ó la de actuar como chaperoninas que directamente median el ensamblaje proteico<sup>(95, 96)</sup>. Así se unen a cadenas nacientes de polipéptidos a fin de lograr el retardo transitorio en su plegamiento hasta que la síntesis se haya completado, establecen la conformación adecuada de dichas cadenas para su translocación a través de las membranas de las organelas, impiden la agregación intermolecular ó intramolecular y transportan metabolitos tóxicos para su degradación por proteosomas<sup>(113)</sup>. Cuando una célula está estresada se produce la disociación de los complejos oligoméricos y de los péptidos no ensamblados. En estas circunstancias, un posible rol de las *Hsps* sería revertir tales acontecimientos, pero, una vez que el re-ensamblaje se hace imposible, las *Hsps* deberían acelerar la eliminación de las proteínas desnaturalizadas<sup>(114, 115)</sup>. Las chaperonas involucran reacciones dependientes de ATP y en su actuación se crea una red sinérgica entre diferentes chaperonas que mantiene la homeostasis bajo condiciones no permisivas para los plegamientos espontáneos<sup>(116)</sup>. Uno de sus efectos beneficiosos es el de participar activamente en la última fase de la cicatrización y regeneración, cuando el estrés oxidativo pudiera evitar la reparación tisular<sup>(103)</sup>.

La regulación de las *Hsps* está relacionada con los factores de transcripción de éstas proteínas (HSFs), de los cuales existen cuatro tipos. Las proteínas celulares desnaturalizadas se acumulan como consecuencia del choque térmico, interaccionando con hsp70 y 90 y liberándolas del complejo que forman con HSF1 y activando así a este último<sup>(117)</sup>. Se ha comprobado como estos factores tienen una activación transcripcional muy rápida así como una desactivación igual de veloz tras la recuperación<sup>(118)</sup>.

Las *Hsps* 90,70 y 60 son consideradas como las *Hsps* encaminadas a proteger, preservar y recuperar la función de varios complejos proteicos. Otro grupo de *Hsps* participarían en la degradación de proteínas permitiendo actuar en el *turn-over* proteolítico y evitando la acumulación de proteínas desnaturalizadas que podrían resultar tóxicas para la célula. En este sentido destaca un polipéptido pequeño muy conservado denominado ubiquitina encargado de marcar a las proteínas para su degradación. Aunque la ubiquitina no es considerada como una *Hsp*, en el sistema proteolítico dependiente de ubiquitina van a actuar algunas de las *Hsps* regulando ciertos elementos<sup>(88)</sup>.

## 7. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

Es difícil predecir el comportamiento clínico de las lesiones potencialmente malignas y del COCE basándonos simple y subjetivamente en los clásicos parámetros histopatológicos. Es necesario identificar aquellos marcadores biológicos que puedan detectar de un modo más objetivo las lesiones que conlleven un fenotipo agresivo y con peor pronóstico.

Dado que en la carcinogénesis están implicados múltiples mecanismos celulares quedaría justificado el estudio de múltiples moléculas proteicas, ya que es poco probable, que cualquier marcador determine individualmente el comportamiento total del tumor y la interacción tan compleja entre los oncogenes y los genes supresores tumorales<sup>(10)</sup>.

Este trabajo ha sido desarrollando siguiendo la hipótesis general de que la complementación de las técnicas de histología rutinarias con la utilización de marcadores moleculares enriquecería la información obtenida tras el análisis histopatológico.

Presuponemos que los antígenos de grupo histo-sanguíneo A, B, Lewis a, Lewis b, Lewis x, Lewis y , y las Proteínas de Choque Térmico hsp27, hsp60, hsp70 y hsp90 adquieren patrones de expresión diferentes en las lesiones de COCE, áreas adyacentes al COCE, leucoplasias y mucosa control.

Con este trabajo se pretende rechazar la siguiente Hipótesis nula: “No existen diferencias en la expresión de los antígenos de grupo histo-sanguíneo A, B, Lewis a, Lewis b, Lewis x, Lewis y , y las proteínas de choque térmico hsp27, hsp60, hsp70 y hsp90 al comparar lesiones de COCE, áreas adyacentes al COCE, leucoplasias y mucosa control”.

## 8. OBJETIVOS

**8.1. Objetivo principal:** Analizar si la expresión de los antígenos de grupo histo-sanguíneo A, B, Lewis a, Lewis b, Lewis x, Lewis y, y las Proteínas de Choque Térmico *hsp27*, *hsp60*, *hsp70* y *hsp90* en lesiones de COCE, áreas adyacentes al COCE, leucoplasias y mucosa control, muestra patrones de tinción diferentes en estas entidades.

### 8.2. Objetivos secundarios:

- Analizar si la expresión de los antígenos de grupo histo-sanguíneo A, B, Lewis a, Lewis b, Lewis x, Lewis y, y las Proteínas de Choque Térmico *hsp27*, *hsp60*, *hsp70* y *hsp90*, muestra patrones de tinción diferentes en función del **grado de displasia epitelial**.

- Analizar la **influencia de las variables** edad, sexo, alcohol, tabaco, otras enfermedades sistémicas, localización anatómica de la lesión, tipo de lesión clínica, tumor previo, tumor posterior, grado de diferenciación y estadiaje en la **expresión** de los antígenos de grupo histo-sanguíneo y las Proteínas de Choque Térmico a estudio.

- Analizar la influencia de las variables *edad, sexo, alcohol, tabaco, otras enfermedades sistémicas, tratamiento recibido, localización anatómica de la lesión, tipo de lesión clínica, tipo de lesión histológica 1, tipo de lesión histológica 2 (grado de displasia), tumor previo, tumor posterior, grado de diferenciación, estadiaje, histogruposanguíneo* y expresión dicotómica de los antígenos sanguíneos y las proteínas de choque térmico a estudio en la **supervivencia** y en función de los resultados obtenidos analizar cuál de todas las variables es la más eficaz a la hora de discriminar entre los grupos de lesiones.

## II. PACIENTES Y MÉTODOS

Para realizar esta tesis doctoral con mención de doctorado europeo se dividió el trabajo en dos partes:

- **1ª Parte:** Se llevó a cabo en Ginebra (Suiza) a partir de una estancia total de tres meses. El tutor fue el Dr. Tommaso Lombardi y el centro de trabajo “L'Ecole dentaire” en la Facultad de Medicina de Ginebra situada en *Rue Barthélemy-Menn* 19. La investigación aquí realizada consistió en el análisis de la expresión de la **hsp27** en **liquen plano oral** y mucosa oral sana (control). Esta parte del trabajo se presenta en forma de dos artículos, incluidos en el anexo.

El primer artículo se ha publicado en el *European Journal of Dermatology*: Garcia-Garcia V, Bascones Martinez A, Martinelli-Klay CP, Alvarez Fernandez E, Lombardi T and Kuffer R. New perspectives on the dynamic behaviour of oral lichen planus. 2012, *Eur J Dermatol* (in press).

El segundo artículo se ha enviado a publicación y estamos pendientes de su aceptación: Garcia-Garcia V, Bascones Martinez A, Ana I. García-Kass, Martinelli-Klay CP, Alvarez Fernandez E, Lombardi T and Kuffer R. Analysis of the expression of heat-shock protein 27 in patients with oral lichen planus.

- **2ª Parte:** Se llevó a cabo mediante una colaboración entre la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid y el Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Para la financiación del proyecto se contó con la ayuda de la Fundación Santander y una Beca pre-doctoral de la Universidad Complutense de Madrid. El protocolo del proyecto se redacta detalladamente a continuación.

**1. DISEÑO DEL ESTUDIO:** Se trata de un estudio de casos y controles retrospectivo donde se estudian como *casos* lesiones de Carcinomas Orales de Células Escamosas (COCEs), Áreas adyacentes a esos COCEs y Leucoplasias y como *controles* mucosa oral normal.

**2. CONSENTIMIENTO DEL COMITÉ ÉTICO:** Previo al comienzo del Proyecto de investigación se preparó una memoria que fue entregada en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid, donde se aprobó por parte del Comité ético la viabilidad del estudio.

El número de registro fue el B-06/040. El informe del Comité ético se adjunta en el Anexo.

### **3. OBTENCIÓN DEL MATERIAL:**

Para la obtención de los *casos* se revisaron los archivos clínicos del Departamento de Anatomía Patológica del H.G.U. Gregorio Marañón desde el año 2000 hasta el año 2005 en busca de pacientes que habían sido diagnosticados de leucoplasia ó de Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE). Los especímenes correspondientes a las biopsias tomadas a dichos pacientes estaban almacenados en forma de bloques de parafina con los portas con la hematoxilina-eosina tomados, en su día, para el diagnóstico de la lesión. Tras la selección al azar de 800 informes clínicos del servicio de Dermatología y Cirugía Maxilofacial se seleccionaron 150 informes que cumplieron las mencionadas características del diagnóstico de las lesiones y se revisaron al microscopio los portas con la hematoxilina-eosina correspondientes a dichos informes. Para poder ser incluido definitivamente el espécimen en el estudio debía cumplir los siguientes **criterios de inclusión**:

1. Presentar al microscopio una lesión compatible con lo que clínicamente se conoce como leucoplasia ó una lesión compatible con un COCE.
2. Existir suficiente material incluido en el bloque de parafina que se obtuvo tras la biopsia inicial para poder obtener diversas preparaciones.

Los **criterios de exclusión** fueron:

1. Detección de lesiones con características no compatibles ó de compatibilidad dudosa con las lesiones a estudio
2. La existencia de bloques de parafina muy escasos debidos al tamaño de la biopsia ó al agotamiento por el uso en otras pruebas diagnósticas

Los *controles* se obtuvieron de pacientes que habían sido sometidos a cirugías periodontales que abarcaban desde colgajos de reposición apical, hasta alargamientos coronarios e injertos gingivales, previa información y firma del consentimiento informado. El modelo del consentimiento informado se incluye en el Anexo. Estos pacientes debían cumplir los siguientes **criterios de inclusión**:

1. No presentar alguna contraindicación médica para la toma de la biopsia
2. No fumar

3. No tomar alguna medicación que pudiera influir a nivel oral

Tras la realización de la biopsia, el espécimen se introdujo en un bote con formaldehído al 10%. Se obtuvieron 70 especímenes. Una vez obtenidos los portas correspondientes a la hematoxilina-eosina y tras la valoración al microscopio óptico, los **criterios de exclusión** fueron los siguientes:

1. Existencia de signos clínicos de inflamación ó presencia de alguna lesión visible,
2. Áreas correspondientes a zonas de cicatrización,

Debido al hecho de la posible asociación con una sobreexpresión de Hsps<sup>(119-122)</sup>.

Los especímenes definitivos que pasaron a formar parte de nuestro estudio fueron:

- 22 COCEs
- 34 áreas adyacentes a los COCEs
- 29 Leucoplasias
- 21 Mucosa normal (controles)

#### **4. PREPARACIÓN DE LOS ESPECÍMENES:**

Tras la obtención de las biopsias mediante bisturí frío, se hizo un procesamiento que incluyó la fijación de los tejidos, la preparación de los bloques de parafina y el consiguiente montaje en los portas. A continuación se realizó un análisis de inmunohistoquímica con la técnica avidina-biotina-peroxidasa previa recuperación antigénica para la detección de los histo-antígenos sanguíneos y las Proteínas de Choque Térmico a estudio. Es importante destacar que en los *casos* (COCE y leucoplasia), como ya estaban almacenados en forma de bloques de parafina, se empezó el protocolo a partir del punto C (Obtención de las secciones del tejido), sin embargo, en los *controles* se siguió el protocolo completo. Las siguientes líneas muestran la descripción de cada uno de los pasos seguidos.

##### **A. Fijación de los tejidos**

La fijación es necesaria para optimizar la preservación de los tejidos. El fijador ideal debe preservar la integridad antigénica y evitar la eliminación, difusión o desplazamiento del antígeno durante el procesamiento posterior. El fijador utilizado fue el formaldehído neutro tamponado al 10%. Se ha demostrado que el formol puede

preservar razonablemente la morfología y conservar mejor los carbohidratos antigénicos. No obstante, siendo conscientes de que el etanol utilizado como fijador hace que se produzcan menores alteraciones, el procesamiento incluirá la inmersión del espécimen en etanol al 100% consiguiendo de esta manera que los tejidos tengan una fijación doble en etanol y en formaldehído<sup>(123)</sup> y comenzando la deshidratación de la pieza para la inmersión en parafina.

## B. Obtención de los bloques de parafina

La parafina se utiliza para endurecer los tejidos y así poder obtener secciones de los mismos. En el proceso de inclusión en parafina se introduce el espécimen en una cápsula de plástico hermética con rejilla y se sumerge en una batería de alcoholes de graduación creciente hasta llegar al etanol al 100%. (Ver tabla X). De esta forma el tejido se deshidrata, al sustituirse el agua por alcohol. El alcohol se extrae mediante un agente aclarante, xileno, ó parafinas de bajo punto de fusión mediante inmersión en 3 baños sucesivos de 20 minutos. Por último se sumerge en parafina de modo que el xileno es sustituido por la parafina y posteriormente se confeccionan los bloques de parafina con la muestra debidamente orientada para su posterior sección en el micrótopo. Estos bloques se conservarán a temperatura ambiente. *Ver figura 9.*

PRODUCTO	Nº DEBAÑOS	TIEMPO
Etanol de 96°	1	30 minutos
Etanol puro	6	60 minutos
Xileno	3	20 minutos
Parafina	3	4 horas

**Fig.9. Esquema del procesado para la obtención de los bloques de parafina.**

## C. Obtención de las secciones de tejido

Mediante un micrótopo se realizan cortes en los bloques de parafina con un espesor de 5µ y se colocan en un baño de flotación. Posteriormente se desplazan encima de los portas xilanizados quedando adheridos. A continuación se colocan en cestas histológicas y se secan en una estufa a 37°C durante 2 h.



#### D. Montaje de los especímenes

Para poder aplicar los anticuerpos monoclonales que nos permitan visualizar los marcadores moleculares que vamos a estudiar hay que eliminar la parafina revirtiendo el proceso descrito hasta ahora. Para ello, se realizarán 3 baños en xileno de 20 minutos de duración/baño y se aplicará la batería de alcoholes en sentido decreciente (*Ver figura 9*) hasta llegar al agua destilada donde se llevará a cabo un baño de 5 minutos produciéndose la rehidratación de los tejidos.

#### E. Recuperación antigénica

Fraenkel-Conrat y cols., en 1947, documentaron que las reacciones químicas que tienen lugar entre las proteínas y el formol deberían revertirse para poder **desenmascarar los epítomos antigénicos** que hayan podido quedar ocultos por determinados mecanismos<sup>(123)</sup>.

La técnica utilizada es la descrita por Shi y cols., en 1991, mediante la cuál los cortes desparafinizados se colocan en jarras de Coplin que contienen la solución de recuperación antigénica (Citrato sódico 10mM, pH6, ChemMate<sup>TM</sup> Dako). Las jarras se calientan en el micro-ondas durante 10 minutos a partir de que hierva, dividiendo en 2 ciclos de 5 minutos con un intervalo de 1 minuto entre los ciclos para revisar el nivel de fluido en las jarras. Si fuera necesario se añade más solución de recuperación antigénica tras los 5 primeros minutos para evitar la deshidratación de los especímenes. Tras esto, se sacan las jarras de Coplin del microondas y se dejan enfriar 15 minutos. Se lavan los cortes 2 veces con agua destilada y en PBS (solución tampón 0,01M y pH 7.4) durante 5 minutos.

Además es necesario llevar a cabo el **bloqueo de la peroxidasa endógena** ya que la peroxidasa queda preservada en la parafina y la no eliminación de la misma podría hacer aparecer falsos positivos al utilizar enzimas similares como marcajes. La técnica empleada se basa en la incubación de los especímenes en una mezcla de metanol y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en solución acuosa) durante 10 minutos. Asimismo se lleva a cabo el bloqueo de la biotina endógena mediante el cubrimiento de los portas con suero salino al 10% en TBS (Tris-buffered saline) para bloqueando así la unión no específica del anticuerpo primario con otras estructuras. Posteriormente se hacen lavados en PBS (dos periodos de 5 minutos) .

## F. Incubación de los portas con los anticuerpos monoclonales primarios/control negativo/control positivo

La incubación se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los 10 anticuerpos monoclonales utilizados fueron los descritos en la *Figura 10*.

El control de la calidad en el estudio de inmunohistoquímica va dirigido a detectar, reducir y corregir las deficiencias del proceso de análisis y poder llevar a cabo una interpretación correcta de los resultados. Deben utilizarse controles positivos y negativos<sup>(123)</sup>. Un *control positivo* es aquel del que se sabe que contiene el antígeno en estudio.

El *control negativo* se utiliza para confirmar la especificidad del método y detectar la posible tinción no específica de fondo. En este estudio se ha llevado a cabo mediante la sustitución del anticuerpo primario por suero salino en un porta de cada lote de anticuerpos.

Los *controles internos* están presentes cuando el tejido a estudiar contiene el antígeno en el tejido normal adyacente. La existencia de *controles internos positivos* indica una inmunoreactividad apropiada. En el caso de los antígenos de grupo histosanguíneo A y B se utilizaron como controles internos los vasos y los hematíes<sup>(124)</sup>.

ANTÍGENO	ANTICUERPO	CLON	DILUCIÓN	MARCA
<b>GRUPO A</b>	Ac M ratón Anti-Grupo A, BG-2	T36	1:60	SIGNET
<b>GRUPO B</b>	Ac M ratónr Anti-Grupo B, BG-3	CLCP-19B	1:60	SIGNET
<b>LEWIS a</b>	Ac M ratón Anti-Lewis a, BG-5	T174	1:60	SIGNET
<b>LEWIS b</b>	Ac M ratón Anti-Lewis b, BG-6	T218	1:60	SIGNET
<b>LEWIS x</b>	Ac M ratón Anti-Lewis x, BG-7	P12	1:60	SIGNET
<b>LEWIS y</b>	Ac M ratón Anti-Lewis y, BG-8	G3.1	1:60	SIGNET
<b>Hsp27</b>	Ac M ratón Anti-Hsp27, Ab-1	G3.1	1:70	Thermo scientific
<b>Hsp60</b>	Ac M ratón Anti-Hsp60, Ab-1	LK1	1:70	Thermo scientific
<b>Hsp70</b>	Ac M ratónAnti-Hsp70, Ab-2	W27	1:80	Thermo scientific
<b>Hsp90</b>	Ac M ratón Anti-Hsp90, Ab-2	JPB24	1:80	Thermo scientific

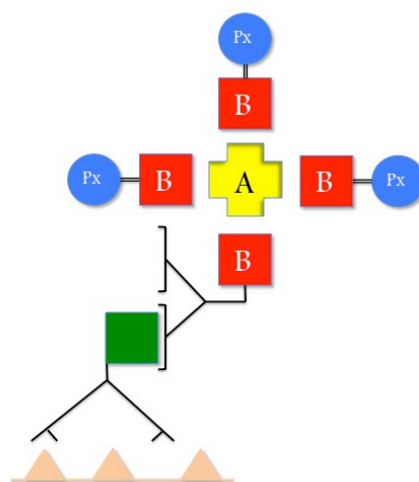
**Fig.10. Anticuerpos monoclonales utilizados y las diluciones.** Ac M= anticuerpo Monoclonal.

Tras la incubación con los anticuerpos monoclonales primarios, nuevamente se hacen lavados en PBS (dos periodos de 5 minutos) .

**G. Aplicación del anti-anticuerpo.** Se trata del anticuerpo secundario que va conjugado con biotina.

#### **H. Aplicación del conjugado avidina-biotina (ABC)**

Se sumergen las muestras en complejos preformados de avidina-biotina-peroxidasa de caballo durante 25 minutos a temperatura ambiente. Esto permite que por cada epítipo detectado se puedan visualizar varias peroxidasas<sup>(123)</sup>. Nuevamente se hacen lavados en PBS (dos periodos de 5 minutos) . *Ver Figura 11.*



**Fig.11. Esquema del sistema Avidina-Biotina-Peroxidasa.** Un anticuerpo secundario biotinilado sirve como nexo de unión del anticuerpo primario con el complejo preformado de Avidina, Biotina y Peroxidasa. B=Biotina, A= Avidina, Px= Peroxidasa. Modificado de Taylor CR, Cote RJ. Immunomicroscopy: A diagnostic tool for the surgical Pathologist, 3rd ed.Philadelphia: WB Saunders; 2005:22.

#### **I. Visualización de la peroxidasa**

La peroxidasa marcada con Diaminobencidina (DAB) produce una multiplicación de la señal demostrable que se traduce en una mayor intensidad y extensión de la señal visible en microscopía óptica. La DAB da un producto de la reacción marrón y es resistente al alcohol permitiendo su uso con multitud de contratinciones y montajes<sup>(123)</sup>.

## **J. Contratación y montaje**

El último paso consiste en lavar las muestras con agua destilada, 2 baños de 3 minutos, para posteriormente contrastarlas con hematoxilina ,5 minutos, deshidratarlas con etanol mediante el sistema de alcoholes crecientes, 1 minuto por baño, aclararlas con xileno, 5 minutos y cubrirlas con el adhesivo de montaje Permount®.

## **5. RECuento DE LA EXPRESIÓN**

Para hacer la valoración de la expresión de los antígenos moleculares en los *casos* y *controles* se han llevado a cabo los siguientes análisis:

**5.1. Análisis de intensidad y porcentaje de células teñidas:** El método utilizado para el recuento fue un método *semi-cuantitativo* mediante el cual las preparaciones se observan al completo en el microscopio óptico determinando el porcentaje de células que expresaban tinción.

a) *Validación del método:* Se llevó a cabo una validación del método de recuento semi-cuantitativo. Para ello, dos examinadores, V.G. y E.A., tras seleccionar al azar 17 preparaciones, realizaron el recuento total del número de células teñidas por estratos (basal y suprabasal) de tal forma que V.G. utilizó una pantalla (Nikon) acoplada a un microscopio óptico (Olympus Bx40) con cámara (Nikos Digital SM-5M Sight) y mediante un software fue señalando todas y cada una de las células que constituían la preparación, diferenciando las células teñidas de las no teñidas, mientras que E.A. llevó a cabo el recuento utilizando el método semi-cuantitativo y calculando del total de la lesión el porcentaje de células que expresaban tinción.

b) De cada preparación se seleccionó el corte más completo y en el que se podían excluir artefactos. Cada corte seleccionado se dividió por estratos: basal, suprabasal y superficial. En el análisis al microscopio óptico se apreció en el estrato superficial que la presencia de campos de células paraqueratósicas ó queratinizadas no permitía descartar la presencia de artefacto por adsorción de los reactivos, por lo que se decidió excluir este estrato del análisis, analizando finalmente en cada corte seleccionado el *estrato basal* y el *estrato suprabasal*.

c) Se analizó la *intensidad de la tinción* en cada estrato por categorías, calculando, en cada estrato, el porcentaje de células teñidas de cada categoría. Las

lesiones a estudio se corresponden a las variables *lesión histológica 1*, que contempla los cuatro grupos principales (COCE, área adyacente a COCE, Leucoplasia y mucosa control y *lesión histológica 2*, que considera el grado de displasia epitelial. Las categorías de intensidad fueron las que siguen:

- Intensidad negativa:0
- Intensidad leve:1
- Intensidad moderada/fuerte:2

d) Se calculó el *porcentaje total de células teñidas* en cada estrato independientemente de la intensidad en las lesiones a estudio que se corresponden con las variables *lesión histológica 1* y *lesión histológica 2*.

## **5.2.Análisis comparativo de los patrones de expresión de los antígenos moleculares considerando la expresión dicotómica de la tinción en función de la variable *lesión histológica 1*:**

Dentro de este apartado se llevaron a cabo los siguientes sub-análisis:

**5.2.1.Análisis de tinción Horizontal.** Este análisis incluye a su vez dos análisis :

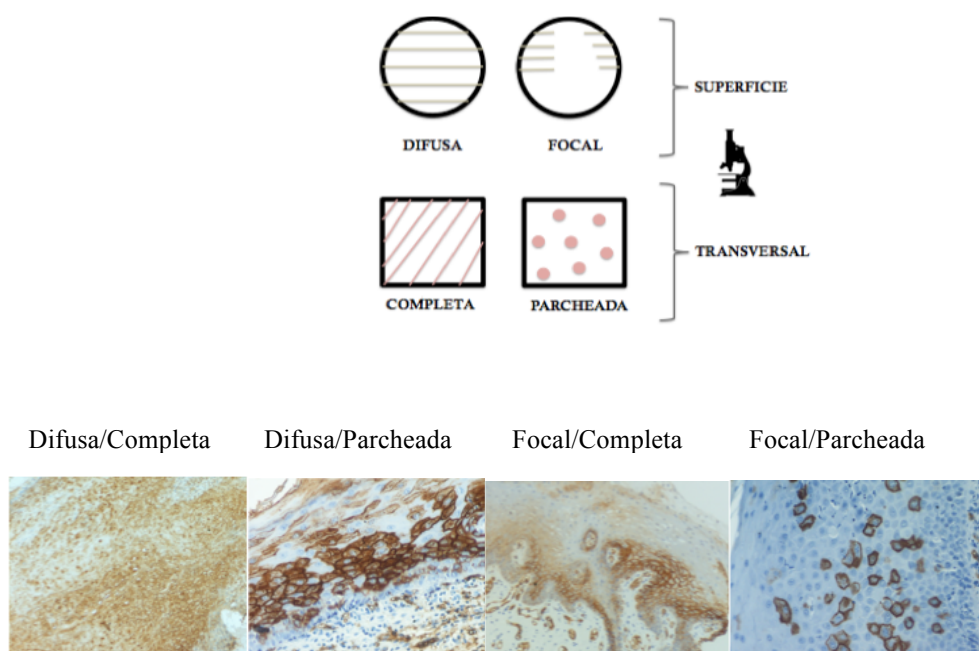
*A. Tipo de tinción en superficie:* Se observa el total de la preparación al microscopio óptico a bajo aumento (40X) y se anota si existen:

- Campos extensos confluentes de positividad: **tinción difusa (D).**
- Campos pequeños positivos alternando con campos negativos: **tinción Focal (F).**

*B. Tipo de tinción transversal:* Se observan los campos con positividad al microscopio óptico a 40X y se anota si existe:

- Positividad difusa de todas las células del área positiva (generalmente respetando el estrato germinal): **tinción Completa (C).**
- Positividad microheterogénea con alternancia en los campos de positividad de células positivas y negativas: **tinción Parcheada (P).**

Así, dentro del análisis de tinción Horizontal, las 4 posibilidades son tinción difusa y completa (DC), tinción difusa y parcheada (DP), tinción focal y completa (FC) y tinción focal y parcheada (FP). Ver *Figura 12*.



**Fig.12. Esquema con el tipo de tinción Horizontal.**

**5.2.2. Análisis de tinción Vertical:** Este análisis contempla los estratos, basal y suprabasal, que se han teñido. Las 3 posibilidades son la tinción exclusiva del estrato basal (B), la tinción exclusiva del estrato suprabasal (SB) y la tinción simultánea de ambos estratos (BSB).

**5.2.3. Análisis de la Localización intracelular de la tinción:** Este análisis se basa en la localización, dentro de la célula, del antígeno a estudio. Las 7 posibilidades que tenemos son tinción del citoplasma (C), tinción del núcleo (N), tinción de la membrana (MB), tinción simultánea del C y el N(CN), tinción simultánea del C y la del N y la MB(NMB).

**5.3. Análisis de la influencia de determinadas variables en la expresión dicotómica de la tinción de los distintos antígenos moleculares :**

En este análisis se valoró la expresión positiva ó negativa de los antígenos sanguíneos y de las proteínas de choque térmico en los *casos* y *controles* correlacionando esta expresión con las variables edad, sexo, alcohol, tabaco, otras enfermedades sistémicas, localización anatómica de la lesión, tipo de lesión clínica, tumor previo, grado de diferenciación y estadiaje .

**5.4. Análisis de supervivencia:** Se llevó a cabo un análisis de supervivencia por lesión, calculando la supervivencia desde el día de la biopsia diagnóstica hasta la fecha

del último seguimiento (ó fallecimiento). Los datos del estado de los pacientes se representan como 0, si el paciente vive; como 1, si el paciente ha muerto por cáncer (oral y/o no oral) y como 2 si se han perdido los datos ó ha muerto por una causa diferente al cáncer.

**5.5. Árbol de decisiones:** Para poder analizar de un grupo de variables cuáles discriminaban mejor entre los grupos de COCEs, Áreas adyacentes, Leucoplasias y Controles, se llevó a cabo un árbol de decisiones.

## **6. VARIABLES DE ESTUDIO:**

### **6.1. Variables principal:**

Intensidad y porcentaje de células teñidas en función de la variable *lesión histológica 1* . Esta variable, tal y como se ha comentado anteriormente, contempla los cuatro grupos principales: COCE(C), Área adyacente a COCE(A), Leucoplasia(L) y mucosa control(NM).

### **6.2. Variables secundarias:**

a. Intensidad y porcentaje de células teñidas en función de la variable *lesión histológica 2* . Esta variable contempla 8 grupos:

1. A.0: área adyacente a COCE sin displasia
2. A.1: área adyacente a COCE con displasia de bajo grado
3. A.2: área adyacente a COCE con displasia de alto grado
4. C: COCE
5. L.0: leucoplasia sin displasia
6. L.1: leucoplasia con displasia de bajo grado
7. L.2: leucoplasia con displasia de alto grado
8. NM: Mucosa Control.

b. *Tinción horizontal, vertical y localización intracelular de la tinción.* Estas variables se han descrito en detalle anteriormente.

c. *Tinción dicotómica* . Esta variable presenta sólo dos posibilidades, Sí tinción ó No tinción. Esta variable se analizará correlacionándola con otras variables.

d. *Edad.* Con esta variable se hicieron arbitrariamente los siguientes rangos: de 0 a 44 años, de 45 a 65 años y mayores de 65 años.

e. *Sexo.* Contempla dos posibilidades: Hombre ó Mujer.

f. *Otras enfermedades sistémicas*. Esta variable hace referencia a si el paciente tiene otras enfermedades diferentes a las lesiones en la boca. Como ejemplos pacientes con hipercolesterolemia, hipertensión y enfermedad tiroidea. Lo simplificamos con dos posibles respuestas: Si ó No.

g. *Tabaco*. Esta variable contempla si el paciente es Fumador habitual (F), No Fumador (NF) ó Exfumador (EXF). Siguiendo el criterio de la OMS, se define como *Fumador* a toda persona que ha fumado diariamente durante el último mes cualquier cantidad de cigarrillos, incluso uno; como *Ex-fumador* a aquellas personas que, habiendo sido fumadores, no han consumido tabaco en los últimos 6 meses aunque el criterio más utilizado actualmente y en el que nos basaremos, es el que considera ex fumador a la persona que, habiendo sido fumador, lleva 1 año sin fumar, ya que en estos casos se estima que menos de un 10% volverá a hacerlo y como *No fumador* a los sujetos que nunca han tenido una exposición al tabaco de forma activa ni mantenida.

h. *Alcohol*. Esta variable se refiere a si el paciente es un consumidor habitual de alcohol (Si) ó no (No).

i. *Localización anatómica*. Esta variable considera el epitelio a partir del cuál se forma la lesión. Siguiendo a *Rautava et al.*<sup>(5)</sup> tenemos 4 posibilidades:

- 1.Epitelio especializado (dorso lengua): D
- 2.Epitelio queratinizado (masticatorio): Q
- 3.Epitelio no queratinizado (de recubrimiento): NQ
- 4.Epitelio lingual (borde lateral de la lengua entre el dorso y el epitelio no queratinizado del suelo de la boca): L.

j. *Lesión clínica*. Esta variable hacer referencia a los subtipos clínicos de COCE y de Leucoplasia. No aplicable a las áreas adyacentes y a la mucosa control. 5 posibilidades:

- 1.COCE Mixto: CM
- 2.COCE Ulcerado: CU
- 3.COCE Exofítico: CE
- 4.Leucoplasia Homogénea: LH
- 5.Leucoplasia No Homogénea: LNH

k. *Grado de diferenciación*. Esta variable sólo es aplicable al COCE. Existen 3 posibilidades:

- 1.Bien Diferenciado: BD
- 2.Moderadamente Diferenciado: MD



### 3. Pobremente Diferenciado: PD

*l. Estadíaje tumoral.* Esta variable sólo es aplicable al COCE. Se basa en la clasificación TNM del tumor. Tenemos 5 estadios:

- a. Estadio 0: 0
- b. Estadio 1:1
- c. Estadio 2:2
- d. Estadio 3:3
- e. Estadio 4: 4

*m. Histo-grupo sanguíneo.* Esta variable se ha obtenido al mirar al microscopio óptico la tinción de los vasos y de los hematíes y se ha correlacionado con la historia clínica de los pacientes. En general hubo coincidencia entre los datos obtenidos por ambas fuentes. El paciente podrá ser del Grupo A, Grupo B, Grupo AB ó Grupo 0.

*n. Tratamiento recibido.* Este tratamiento no influye en los resultados de la tinción de cada lesión, ya que se aplica el tratamiento posterior a la biopsia. Esta variable nos interesa por ver la influencia en la aparición de tumores posteriormente a la toma de la biopsia y en la supervivencia del paciente. Existen 4 posibilidades:

- a. No tratamiento(sólo vigilancia): 0
- b. Cirugía (convencional ó con láser): 1
- c. Cirugía más Radioterapia: 2
- d. Cirugía más Radioterapia más Quimioterapia: 3
- e. Vitamina A: 4

*o. Tumores previos a la biopsia.* Esta variable se ha seleccionado para ver si se trata de un paciente predispuesto a desarrollar cáncer y ver si este hecho hace que la tinción sea diferente a las de pacientes que no han tenido cáncer previo. Dos posibilidades: Sí tumor previo y No tumor previo.

*p. Tumores posteriores a la biopsia.* Con esta variable se analiza si se han teñido de un modo particular los pacientes que posteriormente han desarrollado tumores. Dos posibilidades: Sí tumor posterior y No tumor posterior.

Las características del tumor y del paciente, así como los datos en relación con la demografía, el diagnóstico, el tratamiento y la evolución clínica se recolectaron de forma retrospectiva de la historia clínica de los pacientes.

## 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS 19.0 para Windows.

Los métodos estadísticos utilizados fueron los siguientes (SPSS, 2010):

- Estadística descriptiva de las variables cuantitativas (procedimiento DESCRIPTIVE) para la descripción de las muestras: media, desviación estándar, máximo, mínimo, mediana, desviación estándar de la media, etc. (Ferrán, 1996).
- Estadística descriptiva de las variables cualitativas (procedimiento FREQUENCIES), con la obtención de frecuencias y porcentajes de las categorías. (Ferrán, 1996).
- Tablas de contingencia para la relación entre variables cualitativas (procedimiento CROSSTABS). Test de la chi cuadrado ( $\chi^2$ ) para contrastar la independencia o influencia entre dos variables cualitativas, donde se emplea el test de la chi cuadrado de Pearson con información en cada casilla de la tabla de contingencia del porcentaje en fila y los residuos brutos no tipificados para ayudar a descubrir las tramas en los datos que contribuyen a una prueba de chi-cuadrado significativa. (Everitt, 1992 y Ferrán, 1996).
- Análisis de la varianza, ANOVA (procedimiento ONEWAY), para la comparación de múltiples medias. Cuando el valor global de la F de Snedecor es significativo nos indica que las medias en los grupos no son iguales. Se muestra el test de Bonferroni que realiza comparaciones múltiples de medias, ordenando las medias de menor a mayor y compara las diferencias entre pares (menor-mayor), conectando los grupos que no difieren significativamente. De esta manera halla subconjuntos de medias no significativamente diferentes. Si dos medias se agrupan en un mismo subconjunto no son diferentes significativamente, en otro caso serán diferentes significativamente. (Ferrán, 1996) (Sánchez, 1996).
- Test de la *t* de Student pareada (procedimiento T-TEST) para la comparación muestras relacionadas comparando las medias de un atributo en dos examinadores. (Ferrán, 1996).
- Análisis de supervivencia (procedimiento KM) para comparar las tasas de supervivencia globales entre grupos.
- Árboles de decisión (SPSS, 2010), gráficos que ilustran reglas de decisión de forma que parten de un nodo raíz que contiene todas las observaciones de la muestra y a

medida que se desplaza por el árbol, los datos se ramifican en subconjuntos de datos que se excluyen mutuamente. Se realiza para segmentar, estratificar, predecir e identificar interacciones de variables en la muestra.

### III. RESULTADOS

#### 1. Descripción de la muestra

Se seleccionan 22 COCEs(C), 34 áreas adyacentes (A), 29 Leucoplasias (L) y 21 controles (NM), constituyendo un total de 106 especímenes a analizar. Se contemplan las siguientes clasificaciones:

- Los 22 C se sub-clasificaron en:
  - Según el *tipo clínico*: 15 COCEs Ulcerados (CU), 3 COCEs Exofíticos (CE) y 2 COCEs Mixtos (CM).
  - Según el *grado de diferenciación*: 16 Moderadamente diferenciados (MD), 3 Bien diferenciados (BD) y 2 Pobremente diferenciados (PD)
  - Según el estadiaje: 8 en Estadio I, 3 en Estadio II, 2 en Estadio III, 8 en Estadio IV, 1 no datos.
- Las 34 A se sub-clasificaron, según la variable *lesión histológica 2*, en:
  - 12 Sin Displasia, 15 Con Displasia de Bajo Grado y 7 Con Displasia de Alto Grado
- Las 29 L se sub-clasificaron en:
  - Según el *tipo clínico*: 14 Leucoplasias Homogéneas (LH), 15 Leucoplasias No Homogéneas (LNH)
  - Según la variable *lesión histológica 2*: 13 Sin Displasia, 9 Con Displasia de Bajo Grado y 7 Con Displasia de Alto Grado.

Analizando la *edad*, la mayoría de las lesiones de COCE pertenecieron a pacientes mayores de 65 años, mientras que las lesiones de leucoplasia se distribuyeron fundamentalmente entre los dos rangos a partir de los 44 años y los controles se distribuyeron de forma homogénea entre los tres rangos de edad. En relación con el *género*, hubo una mayor predilección por los hombres en las lesiones de COCE y Leucoplasia y por las mujeres en los controles. Un gran porcentaje de los especímenes pertenecientes a los tres grupos, concretamente el 73,6%, pertenecían a pacientes que presentaban *otras enfermedades sistémicas* concomitantes, destacando, entre otras, la existencia de Diabetes Mellitus tipo I y II, Hipertensión arterial, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedades tiroideas y la existencia de hipercolesterolemia. Analizando el *hábito tabáquico*, en el grupo de los COCEs la

mayoría de las lesiones pertenecían a fumadores, mientras que en el grupo de las leucoplasias no hubo una clara distinción respecto al hábito tabáquico y en el grupo control la mayoría fueron no fumadores y tres casos ex-fumadores desde hacía más de 10 años. En cuanto al *consumo de alcohol*, en el grupo de los COCEs no hubo una clara diferencia entre pacientes bebedores y no bebedores, mientras que en el grupo de las leucoplasias la mayoría de los pacientes fueron no bebedores y en el grupo control ningún paciente fue bebedor. Respecto a la *localización anatómica*, la distribución fue heterogénea entre los tres grupos. Ver Tabla 1.

	EDAD			GÉNERO		E.SIST.		TABACO			ALCOHOL		LOC. ANAT.			
	0-44	45-65	>65	H	M	SI	NO	F	NF	EXF	SI	NO	D	L	NQ	Q
COCE (N=22)	2	7	13	13	9	20	2	12	6	4	12	10	1	6	8	7
LEUCOPLASIA (N=29)	5	12	12	17	12	21	8	11	14	4	8	21	4	10	11	4
CONTROL(N=21)	6	6	7	6	13	8	11	0	16	3	0	19	4	0	2	15

**Tabla 1. Descriptiva de la muestra.** En el grupo control faltaron los datos, a excepción de la localización anatómica, de 2 sujetos. E.SIST= enfermedades sistémicas, LOC.ANAT.= localización anatómica. H=Hombre, M=Mujer, F=Fumador, NF= No fumador, EXF= Ex-fumador, SI= consumidor de alcohol, NO= No consumidor de alcohol, D=Dorso Lingual, L=Borde lateral lingual, NQ=No queratinizada, Q=queratinizada

En referencia a la anamnesis de *tumor previo*, el 22% de las lesiones, habían aparecido en pacientes que habían padecido un tumor previo. De ese porcentaje, el 14,2% pertenecían a pacientes que habían desarrollado tumores orales, el 11,3% a pacientes que habían tenido tumores extraorales y el 6,6% a pacientes que habían tenido tumores orales y extraorales. Los tumores extraorales se originaron en diversos órganos como orofaringe, laringe, parótida, hígado, uretra, próstata y riñón. En cuanto a la anamnesis de *tumor posterior*, el 17,9 % de las lesiones aparecieron en pacientes que a lo largo del tiempo presentaron un nuevo tumor a nivel oral, el 16% en pacientes que desarrollaron tumores extraorales y el 7,5% de las lesiones en pacientes que presentaron nuevos tumores orales y otros tumores extraorales. Los tumores extraorales se originaron en diversos órganos como laringe, epiglotis, parótida, cerebro y pulmón.

Respecto al *histo-grupo sanguíneo*, 52 lesiones pertenecían a pacientes que eran del grupo A (49,1%), 40 lesiones a pacientes del grupo O (37,7%), 12 lesiones a pacientes del grupo AB (11,3%) y sólo 2 lesiones a pacientes del Grupo B (1,9%).

## 2. Resultados de la validación del método de recuento:

Al comparar los resultados obtenidos por ambos examinadores no hubo diferencias estadísticamente significativas en el recuento total de células en el epitelio, ni específicamente por estratos, tanto en el estrato basal ( $p=0,159$ ), como en el estrato suprabasal ( $p=0,337$ ). Ver Tablas 2 y 3.

	Diferencias relacionadas					Sig. (bilateral)
	Media	Desviación típica	Error típico de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia		
				Inferior	Superior	
Nº CÉLULAS TEÑIDAS EXAMINADOR 1(V.G)(%) - Nº CÉLULAS TEÑIDAS EXAMINADOR 2(E.A.) (%)	- 4,21857	6,94896	2,62646	- 10,64529	2,20815	<b>0,159</b>

**Tabla 2. Validación del método semi-cuantitativo.** Prueba de muestras relacionadas (t student pareada) en el estrato basal.

	Diferencias relacionadas					Sig. (bilateral)
	Media	Desviación típica	Error típico de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia		
				Inferior	Superior	
Nº CÉLULAS TEÑIDAS EXAMINADOR 1(V.G.)(%) - Nº CÉLULAS TEÑIDAS EXAMINADOR 2(E.A.) (%)	-0,67	2,08837	0,6604	- 2,16393	0,82393	<b>0,337</b>

**Tabla 3. Validación del método semi-cuantitativo.** Prueba de muestras relacionadas (t student pareada) en el estrato suprabasal.

## 3. Redacción de los resultados por marcador

A continuación se redactan los diferentes resultados de los análisis llevados a cabo específicamente por cada marcador. Durante el procesado de las muestras, varios especímenes se deterioraron y, de algunos de ellos se pudieron obtener varios cortes, pero de otros no por el agotamiento de los bloques de parafina. Es por ello que debajo de cada tabla viene especificado el tamaño muestral (N), en color gris, para cada marcador.

### 3.1. GRUPO A:

#### 3.1.1. Resultados del análisis de intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno de Grupo A:

En el *estrato basal* el antígeno de grupo A se expresó en un % muy bajo de células, <10% en los 4 grupos, si bien la intensidad de la tinción en este estrato fue principalmente moderada/fuerte. No hubo DES entre los grupos. Teniendo en cuenta el grado de displasia, se observan resultados similares, escasa expresión del antígeno de grupo A en este estrato.

En el *estrato suprabasal* la tinción fue variable, siendo los C las lesiones que menos se tiñeron, tan sólo un 12,5% de las células, seguidos por un 24% de las células en los NM, un 40% en las A, y un 47% en las L. La intensidad de la tinción fue moderada/fuerte. Hubo DES al comparar los C con las L tanto en el análisis de la intensidad como en el porcentaje total de células ( $p=0,023$ ). Teniendo en cuenta el grado de displasia, hubo DES ( $p=0$ ) tanto en el análisis de intensidad como en el porcentaje total de células, al comparar los C, con tan sólo un 12,5% de las células teñidas, con las A.0 y las L.0, con un 67% de células teñidas respectivamente, siendo la intensidad en todos ellos moderada/fuerte. Ver Tablas 4 y 5.

	0BL	1BL	2BL	0SB	1SB	2SB	% BL	% SB
A	94	0	6	60	0	40	6	40
C	90	5	5	87,5	0	12,5	10	12,5
L	90	0	10	53	0	47	10	47
NM	100	0	0	76	0	24	0	28

**Tabla 4. Intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno de Grupo A en función de la variable lesión histológica I.** 0BL=intensidad(i) negativa estrato basal, 1BL=i leve estrato basal, 2BL=i moderada/fuerte estrato basal, 0SB= i negativa estrato suprabasal, 1SB=i leve estrato suprabasal, 2SB=i moderada/fuerte estrato suprabasal, A=área adyacente a COCE, C=COCE, L=Leucoplasia, NM=control. Se expresa el número de células en forma de %. N Grupo A: A=34, C=20, L=29, NM=21.

	0BL	1BL	2BL	0SB	1SB	2SB	% BL	% SB
A.0	92	0	8	33	0	67	8	67
A.1	93	0	7	75	0	25	7	25
A.2	100	0	0	75	0	25	0	25
C	90	5	5	87,5	0	12,5	10	12,5
L.0	85	0	15	33	0	67	15	67
L.1	100	0	0	67	0	33	0	33
L.2	86	0	14	71	0	29	14	29
NM	100	0	0	76	0	24	0	28

**Tabla 5. Intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno de Grupo A en función de la variable lesión histológica 2.** 0BL=i negativa estrato basal, 1BL=i leve estrato basal, 2BL=i moderada/fuerte estrato basal, 0SB= i negativa estrato suprabasal, 1SB=i leve estrato suprabasal, 2SB=i moderada/fuerte estrato suprabasal, A.0=área adyacente a COCE Sin Displasia (D), A.1= área adyacente a COCE Con D Bajo grado, A.2= área adyacente a COCE Con D Alto grado, C=COCE, L.0=leucoplasia Sin D, L.1= leucoplasia Con D Bajo grado, L.2= leucoplasia Con D Alto grado, NM=control. Se expresa el número de células en forma de %. N Grupo A: A.0=12, A.1=15, A.2=7, C=20, L.0=13, L.1=9, L.2=7, NM=21.

### 3.1.2.Resultados del análisis comparativo de patrones de expresión específicos del antígeno de Grupo A en función de la variable lesión histológica 1:

- **Tinción Horizontal:** de las lesiones que expresaron grupo A, los dos patrones más frecuentes de tinción fueron DC y FP. Haciendo una comparativa entre los grupos, los C fueron, en general, los que menos tinción expresaron, los NM expresaron fundamentalmente el patrón FP. Las L destacaron por expresar el patrón FC hallándose DES al comparar con los otros grupos ( $p=0,13$ ). Ver Tabla 6.

	GRUPO A				GRUPO B				LEWIS a				LEWIS b				LEWIS x				LEWIS y			
	A	C	L	NM	A	C	L	NM	A	C	L	NM	A	C	L	NM	A	C	L	NM	A	C	L	NM
DC	32	10	24	9.5	0	0	3	14	6	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0	62	70	68	84
DP	3	0	0	1	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
FC	0	0	7	2	0	5	0	5	3	0	3.5	5	3	0	4	0	9	0	14	0	3	0	4	0
FP	15	5	31	23	5	0	0	5	15	25	21	0	41	35	36	19	32	55	50	0	30	30	25	10.5
NT	50	85	38	53	29	95	93	76	76.5	75	76	95	53	65	61	81	56	45	35.7	100	3	0	4	5

**Tabla 6. % de casos que expresan un determinado patrón de tinción Horizontal con los antígenos de Grupo Sanguíneo ABO y Lewis.** A=Área adyacente a COCE, C=COCE, L=Leucoplasia, NM= Mucosa Normal. DC=Difuso Completo, DP= Difuso Parcheado, FC= Focal Completo, FP= Focal Parcheado, NT= No Tinción. N Grupo A: A=34, C=20, L=29,NM=21; N Grupo B: A=34, C=20, L=29,NM=21; N Lewis a: A=34, C=20, L=29,NM=21; N Lewis b: A=34, C=20, L=28,NM=21; N Lewis x: A=34, C=20, L=28,NM=21; Lewis y: A=34, C=20, L=28,NM=19.

- **Tinción Vertical:** la mayoría de las lesiones que se tiñeron expresaron el grupo A en el estrato SB, sólo un 6,6% expresaron tinción tanto en el estrato B como en el SB. Resaltar que los C destacaron por ser el grupo con menor tinción de estratos,



encontrándose DES al comparar la expresión en el estrato SB respecto de los otros grupos ( $p=0,016$ ). Ver Tabla 7.

	GRUPO A				GRUPO B				LEWIS a				LEWIS b				LEWIS x				LEWIS y			
	A	C	L	NM	A	C	L	NM	A	C	L	NM	A	C	L	NM	A	C	L	NM	A	C	L	NM
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SB	44	5	52	52	15	15	7	24	23.5	25	24	5	47	35	39	19	44	55	64	0	79	40	54	95
BSB	0	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	60	43	0
NT	50	85	38	48	85	95	93	76	76.5	75	76	95	53	65	61	81	56	45	36	100	3	0	4	5

**Tabla 7. % de casos que expresan un determinado patrón de tinción Vertical con los antígenos de Grupo Sanguíneo ABO y Lewis.** A=Área adyacente a COCE, C=COCE, L=Leucoplasia, NM= Mucosa Normal. B=Estrato Basal, SB=Estrato Suprabasal, BSB= Estrato Basal y Suprabasal, NT= No Tinción. N Grupo A: A=34, C=20, L=29,NM=21; N Grupo B: A=34, C=20, L=29,NM=21; N Lewis a: A=34, C=20, L=29,NM=21; N Lewis b: A=34, C=20, L=28,NM=21; N Lewis x: A=34, C=20, L=28,NM=21; Lewis y: A=34, C=20, L=28,NM=19.

- **Localización intracelular de la tinción:** en la mayoría de los casos la tinción fue membranosa y sólo en 4 casos fue simultáneamente citoplasmática. Ver Tabla 8.

	GRUPO A				GRUPO B				LEWIS a				LEWIS b			
	A	C	L	NM	A	C	L	NM	A	C	L	NM	A	C	L	NM
MB	44	15	55	52	9	0	7	0	23.5	20	24	5	47	25	39	19
CMB	6	0	7	0	6	5	0	24	0	5	0	0	0	10	0	0
NT	50	85	38	48	85	95	93	76	76.5	75	76	95	53	65	61	81

**Tabla 8. % de casos que expresan tinción con los antígenos de grupo A, B y Lewis a y b en una determinada localización intracelular.** A=Área adyacente a COCE, C=COCE, L=Leucoplasia, NM= Mucosa Normal. MB=Membrana, CMB= Citoplasma y Membrana, NT= No Tinción. N Grupo A: A=34, C=20, L=29,NM=21; N Grupo B: A=34, C=20, L=29,NM=21; N Lewis a: A=34, C=20, L=29,NM=21; N Lewis b: A=34, C=20, L=28,NM=21.

### 3.1.3. Resultados del análisis de la influencia de determinadas variables en la expresión dicotómica de la tinción del antígeno de Grupo A:

Al analizar la influencia de las variables a estudio en la posible expresión del histo-antígeno de Grupo A se detectan los siguientes resultados estadísticamente significativos:

- Variable *sexo*: un 56% de los hombres expresaron el antígeno A en comparación con un 35% de las mujeres existiendo DES ( $p=0,042$ ). Ver Tabla 9.
- Variable *tabaco*: se detectan DES ( $p=0,009$ ) al comparar F, 43% de las lesiones que pertenecían a pacientes fumadores expresaron el antígeno del grupo A, con NF, 36% de las lesiones, y con EXF, 78% de las lesiones , y al comparar NF con EXF. Ver Tabla 10.
- Resto de las variables: no se observan DES.

	G. A	G. B	Le a	Le b	Le x	Le y	hsp27	hsp60	hsp70	hsp90
H	56	15	24	37	50	94	98	67	65	13
M	35	8	17	38	24	100	100	64	62	28

**Tabla 9. Análisis dicotómico de la expresión de los antígenos en función de la variable sexo.**

G.A=Grupo A, G.B=Grupo B, Le a=Lewis a, Le b=Lewis b, Le x=Lewis x, Le y= Lewis y, H= Hombres, M=Mujeres. Se expresan los casos en forma de %. N Grupo A: H=54, M=48; N Grupo B: H=54, M=48; N Lewis a: H=54, M=48; N Lewis b: H=54, M=47; N Lewis x: H=54, M=47; Lewis y: H=53, M=46; N hsp27:H=54, M=47; N hsp60: H=54, M=47; N hsp70: H=54, M=47; N hsp90: H=54, M=47.

	G. A	G. B	Le a	Le b	Le x	Le y	hsp27	hsp60	hsp70	hsp90
EXF	78	22	17	33	44	94	100	72	67	17
F	43	14	30	32	32	97	97	51	65	3
NF	36	6	15	43	33	98	100	74	61	35

**Tabla 10. Análisis dicotómico de la expresión de los antígenos en función de la variable tabaco.**

G.A=Grupo A, G.B=Grupo B, Le a=Lewis a, Le b=Lewis b, Le x=Lewis x, Le y= Lewis y, EXF= Ex-fumadores, F=Fumadores, NF= No Fumadores. Se expresan los casos en forma de %. N Grupo A: EXF=18, F=37,NF=47; N Grupo B: EXF=18, F=37,NF=47; N Lewis a: EXF=18, F=37,NF=47; N Lewis b: EXF=18, F=37,NF=46; N Lewis x: EXF=18, F=37,NF=46; Lewis y: EXF=18, F=37,NF=44; N hsp27: EXF=18, F=37,NF=46; N hsp60: EXF=18, F=37,NF=46; N hsp70: EXF=18, F=37,NF=46; N hsp90: EXF=18, F=37,NF=46.

## 3.2. GRUPO B:

### 3.2.1.Resultados del análisis de intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno de Grupo B:

En el *estrato basal* no hubo tinción en ninguno de los grupos. No hubo DES al comparar los grupos. Lo mismo pudo observarse al hacer el análisis teniendo en cuenta el grado de displasia epitelial.

En el *estrato suprabasal* la tinción fue también escasa, mostrando el grupo NM un 19% de las células teñidas y el resto de los grupos <6% de las células teñidas con intensidad entre leve y moderada/fuerte. No hubo DES al comparar los grupos. Lo mismo pudo observarse al hacer el análisis teniendo en cuenta el grado de displasia epitelial. Ver Tablas 11 y 12.

	0BL	1BL	2BL	0SB	1SB	2SB	% BL	% SB
A	100	0	0	97	1	2	0	3
C	100	0	0	95,5	3	1,5	0	4,5
L	100	0	0	95	0	6	0	5,6
NM	100	0	0	81	9	10	0	19

**Tabla 11. Intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno de Grupo B en función de la variable lesión histológica 1.** 0BL=i negativa estrato basal, 1BL=i leve estrato basal, 2BL=i moderada/fuerte estrato basal, 0SB= i negativa estrato suprabasal, 1SB=i leve estrato suprabasal, 2SB=i moderada/fuerte estrato

suprabasal, A=área adyacente a COCE, C=COCE, L=Leucoplasia, NM=control. Se expresa el número de células en forma de %. N Grupo B: A=34, C=20, L=29, NM=21.

	0BL	1BL	2BL	0SB	1SB	2SB	% BL	% SB
A.0	100	0	0	97	0	3	0	3
A.1	100	0	0	96	1	2	0	4
A.2	100	0	0	100	0	0	0	0
C	100	0	0	95,5	3	1,5	0	4,5
L.0	100	0	0	95	0	5	0	5
L.1	100	0	0	89	0	11	0	11
L.2	100	0	0	100	0	0	0	0
NM	100	0	0	81	9	10,5	0	19

**Tabla 12. Intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno de Grupo B en función de la variable lesión histológica 2.** 0BL=i negativa estrato basal, 1BL=i leve estrato basal, 2BL=i moderada/fuerte estrato basal, 0SB= i negativa estrato suprabasal, 1SB=i leve estrato suprabasal, 2SB=i moderada/fuerte estrato suprabasal, A.0=área adyacente a COCE Sin D, A.1= área adyacente a COCE Con D Bajo grado, A.2= área adyacente a COCE Con D Alto grado, C=COCE, L.0=leucoplasia Sin D, L.1= leucoplasia Con D Bajo grado, L.2= leucoplasia Con D Alto grado, NM=control. Se expresa el número de células en forma de %. N Grupo B: A.0=12, A.1=15, A.2=7, C=20, L.0=13, L.1=9, L.2=7, NM=21.

### 3.2.2. Resultados del análisis comparativo de patrones de expresión específicos del antígeno de Grupo B en función de la variable lesión histológica 1:

- **Tinción Horizontal:** de las lesiones que expresaron grupo B, los dos patrones más frecuentes de tinción fueron DC y FP. Las A destacaron por ser el grupo que más expresó el patrón FP y los NM el patrón DC ( $p=0,039$ ). Ver Tabla 6.
- **Tinción Vertical:** todas las lesiones que se tiñeron expresaron el grupo B en el estrato SB, y ninguna en el estrato B, no existiendo DES entre los grupos. Ver Tabla 7.
- **Localización intracelular de la tinción:** la tinción varió entre MB exclusivamente y CMB, destacando los NM respecto al resto de especímenes por expresar más tinción CMB de lo esperado ( $p=0,035$ ). Ver Tabla 8.

### 3.2.3. Resultados del análisis de la influencia de determinadas variables en la expresión dicotómica de la tinción del antígeno de Grupo B:

Al analizar la influencia de las variables a estudio en la posible expresión del antígeno de Grupo B , mediante el análisis dicotómico, no se detectan resultados estadísticamente significativos con alguna de las variables a estudio.

### 3.3. LEWIS a:

#### 3.3.1.Resultados del análisis de intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno Lewis a:

En el *estrato basal* no se expresó tinción en ninguno de los grupos. No hubo DES al comparar los grupos. Lo mismo pudo observarse al hacer el análisis teniendo en cuenta el grado de displasia epitelial.

En el *estrato suprabasal* la tinción fue también escasa, mostrando los 4 grupos un % de células teñidas menor del 10% con intensidad moderada/fuerte. No hubo DES al comparar los grupos. Lo mismo pudo observarse al hacer el análisis teniendo en cuenta el grado de displasia epitelial. Ver Tablas 13 y 14.

	0BL	1BL	2BL	0SB	1SB	2SB	% BL	% SB
A	100	0	0	90	0	10	0	10
C	100	0	0	97	0	3	0	3
L	100	0	0	95	0	6	0	6
NM	100	0	0	97	0	3	0	3

**Tabla 13. Intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno Lewis a en función de la variable lesión histológica 1.** 0BL=i negativa estrato basal, 1BL=i leve estrato basal, 2BL=i moderada/fuerte estrato basal, 0SB= i negativa estrato suprabasal, 1SB=i leve estrato suprabasal, 2SB=i moderada/fuerte estrato suprabasal, A=área adyacente a COCE, C=COCE, L=Leucoplasia, NM=control. Se expresa el número de células en forma de %. N Lewis a: A=34, C=20, L=29,NM=21.

	0BL	1BL	2BL	0SB	1SB	2SB	% BL	% SB
A.0	100	0	0	91	0	9	0	9
A.1	100	0	0	84	0	16	0	16
A.2	100	0	0	100	0	0	0	0
C	100	0	0	97	0	3	0	3
L.0	100	0	0	93	0	6,5	0	6,5
L.1	100	0	0	94	0	5,5	0	6
L.2	100	0	0	96	0	3,5	0	4
NM	100	0	0	97	0	3	0	3

**Tabla 14. Intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno Lewis a en función de la variable lesión histológica 2.** 0BL=i negativa estrato basal, 1BL=i leve estrato basal, 2BL=i moderada/fuerte estrato basal, 0SB= i negativa estrato suprabasal, 1SB=i leve estrato suprabasal, 2SB=i moderada/fuerte estrato suprabasal, A.0=área adyacente a COCE Sin D, A.1= área adyacente a COCE Con D Bajo grado, A.2= área adyacente a COCE Con D Alto grado, C=COCE, L.0=leucoplasia Sin D, L.1= leucoplasia Con D Bajo grado, L.2= leucoplasia Con D Alto grado, NM=control. Se expresa el número de células en forma de %. N Lewis a: A.0=12, A.1=15, A.2=7, C=20, L.0=13, L.1=9, L.2=7, NM=21.

### 3.3.2. Resultados del análisis comparativo de patrones de expresión específicos del antígeno Lewis a en función de la variable *lesión histológica 1*:

- **Tinción Horizontal:** de las lesiones que expresaron le<sup>a</sup>, el patrón más frecuente de tinción fue FP(15%), no existiendo DES entre los grupos. *Ver Tabla 6.*
- **Tinción Vertical:** todas las lesiones que se tiñeron expresaron le<sup>a</sup> en el estrato SB, y ninguna en el estrato B, no existiendo DES entre los grupos. *Ver Tabla 7.*
- **Localización intracelular de la tinción:** todos los casos que mostraron expresión positiva de le<sup>a</sup>, a excepción de 1, mostraron tinción MB, ese caso mostró tinción CMB. *Ver Tabla 8.*

### 3.3.3. Resultados del análisis de la influencia de determinadas variables en la expresión dicotómica de la tinción del antígeno Lewis a:

Al analizar la influencia de las variables a estudio en la posible expresión del antígeno Lewis a, mediante el análisis dicotómico, se detectan los siguientes resultados estadísticamente significativos:

- Variable *alcohol* : un 33% de las lesiones que pertenecen a pacientes que consumían alcohol habitualmente expresan le<sup>a</sup>, frente a un 14% de las lesiones que pertenecen a no consumidores habituales( $p=0,019$ ). *Ver Tabla 15.*
- Resto de las variables: no se observan DES.

	G. A	G. B	Le a	Le b	Le x	Le y	hsp27	hsp60	hsp70	hsp90
NO	50	14	14	38	19	97	98	66	63	29
SI	39	8	33	36	50	97	100	64	64	3

**Tabla 15. Análisis dicotómico de la expresión de los antígenos en función de la variable alcohol.**

G.A=Grupo A, G.B=Grupo B, Le a=Lewis a, Le b=Lewis b, Le x=Lewis x, Le y= Lewis y, No= No consumidores habituales de alcohol, Si= Consumidores habituales de alcohol. Se expresan los casos en forma de %. N Grupo A: NO=66, SI=36; N Grupo B:NO=66, SI=36; N Lewis a: NO=66, SI=36; N Lewis b: NO=65, SI=36 ; N Lewis x: NO=65, SI=36; Lewis y: NO=63, SI=36; N hsp27: NO=65, SI=36; N hsp60: NO=65, SI=36; N hsp70: NO=65, SI=36; N hsp90: NO=65, SI=36.

## 3.4. LEWIS b:

### 3.4.1.Resultados del análisis de intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno Lewis b:

En el *estrato basal* no se expresó tinción en ninguno de los grupos. No hubo DES al comparar los grupos. Lo mismo pudo observarse al hacer el análisis teniendo en cuenta el grado de displasia epitelial.

En el *estrato suprabasal* la tinción fue escasa, si bien hubo DES ( $p=0,045$ ), tanto en el análisis de intensidad como en el porcentaje total de células, al comparar las A ,19%

de células con intensidad moderada/fuerte, con el grupo NM, 1% de células teñidas con la misma intensidad. El resto de los grupos mostraron un % de células teñidas inferior al 10% con intensidad principalmente moderada/fuerte. En el análisis teniendo en cuenta el grado de displasia epitelial, se detecta que es específicamente el grupo A.1, con un 25% de células teñidas, el que muestra DES( $p=0,03$ ) al compararlo con el grupo NM, tanto en el análisis de intensidad como en el porcentaje total de células. *Ver Tablas 16 y 17.*

	0BL	1BL	2BL	0SB	1SB	2SB	% BL	% SB
A	100	0	0	81	1	17	0	19
C	100	0	0	92	0	8	0	8
L	100	0	0	90	1	8	0	9,5
NM	100	0	0	100	0	1	0	1

**Tabla 16. Intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno Lewis b en función de la variable lesión histológica 1.** 0BL=i negativa estrato basal, 1BL=i leve estrato basal, 2BL=i moderada/fuerte estrato basal, 0SB= i negativa estrato suprabasal, 1SB= i leve estrato suprabasal, 2SB=i moderada/fuerte estrato suprabasal, A=área adyacente a COCE, C=COCE, L=Leucoplasia, NM=control. Se expresa el número de células en forma de %. N Lewis b: A=34, C=20, L=28, NM=21.

	0BL	1BL	2BL	0SB	1SB	2SB	% BL	% SB
A.0	100	0	0	79,5	0	20	0	20
A.1	100	0	0	75	3	22	0	25
A.2	100	0	0	98,5	0	1,5	0	1,5
C	100	0	0	92	0	8	0	8
L.0	100	0	0	93	0	7	0	7
L.1	100	0	0	85	2	13	0	15
L.2	100	0	0	92	3	5	0	7
NM	100	0	0	99	0	1	0	1

**Tabla 17. Intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno Lewis b en función de la variable lesión histológica 2.** 0BL=i negativa estrato basal, 1BL=i leve estrato basal, 2BL=i moderada/fuerte estrato basal, 0SB= i negativa estrato suprabasal, 1SB=i leve estrato suprabasal, 2SB=i moderada/fuerte estrato suprabasal, A.0=área adyacente a COCE Sin D, A.1= área adyacente a COCE Con D Bajo grado, A.2= área adyacente a COCE Con D Alto grado, C=COCE, L.0=leucoplasia Sin D, L.1= leucoplasia Con D Bajo grado, L.2= leucoplasia Con D Alto grado, NM=control. Se expresa el número de células en forma de %. N Lewis b: A.0=12, A.1=15, A.2=7, C=20, L.0=13, L.1=9, L.2=6, NM=21.

### **3.4.2. Resultados del análisis comparativo de patrones de expresión específicos del antígeno Lewis b en función de la variable *lesión histológica 1*:**

- **Tinción Horizontal:** de las lesiones que expresaron  $le^b$ , el patrón más frecuente de tinción fue FP(33%), no existiendo DES entre los grupos. *Ver Tabla 6.*
- **Tinción Vertical:** todas las lesiones que se tiñeron expresaron  $le^b$  en el estrato SB, y ninguna en el estrato B, no existiendo DES entre los grupos. *Ver Tabla 7.*
- **Localización intracelular de la tinción:** todos los casos que mostraron expresión positiva de  $le^b$ , a excepción de 2, mostraron tinción MB, esos casos mostraron tinción CMB y pertenecían al grupo de los C ( $p=0,034$ ). *Ver Tabla 8.*

### **3.4.3. Resultados del análisis de la influencia de determinadas variables en la expresión dicotómica de la tinción del antígeno Lewis b:**

Al analizar la influencia de las variables a estudio en la posible expresión del antígeno de Lewis b, mediante el análisis dicotómico, no se detectan resultados estadísticamente significativos con alguna de las variables a estudio.

## **3.5. LEWIS x:**

### **3.5.1.Resultados del análisis de intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno Lewis x:**

En el *estrato basal* no se expresó tinción en ninguno de los grupos. No hubo DES al comparar los grupos. Lo mismo pudo observarse al hacer el análisis teniendo en cuenta el grado de displasia epitelial.

En el *estrato suprabasal* la tinción general fue escasa, no obstante hubo DES( $p=0,020$ ), tanto en el análisis de intensidad como en el porcentaje total de células, al comparar las A, un 15% de células teñidas con intensidad moderada/fuerte, con el grupo NM, 0% de células teñidas y hubo una tendencia al comparar también las L, 14% de células teñidas con el grupo NM( $p=0,07$ ). En el resto de los grupos la tinción fue menor del 15% y la intensidad principalmente moderada/fuerte. En el análisis teniendo en cuenta el grado de displasia epitelial, se observan DES( $p=0,02$ ) al comparar el grupo que mostró mayor tinción, las L.0, con un 24% de células teñidas y el grupo NM, con un 0% de células teñidas, tanto en el análisis de intensidad como en el porcentaje total de células. *Ver Tablas 18 y 19.*

	0BL	1BL	2BL	0SB	1SB	2SB	% BL	% SB
A	100	0	0	85	0	15	0	15
C	100	0	0	92	0	8	0	8
L	100	0	0	87	2	11	0	14
NM	100	0	0	100	0	0	0	0

**Tabla 18. Intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno Lewis x en función de la variable lesión histológica 1.** 0BL=i negativa estrato basal, 1BL=i leve estrato basal, 2BL=i moderada/fuerte estrato basal, 0SB= i negativa estrato suprabasal, 1SB=i leve estrato suprabasal, 2SB=i moderada/fuerte estrato suprabasal, A=área adyacente a COCE, C=COCE, L=Leucoplasia, NM=control. Se expresa el número de células en forma de %. N Lewis x: A=34, C=20, L=28,NM=21.

	0BL	1BL	2BL	0SB	1SB	2SB	% BL	% SB
A.0	100	0	0	81	0	19	0	19
A.1	100	0	0	85	0	15	0	15
A.2	100	0	0	91	0	8,5	0	8,5
C	100	0	0	92,5	0	7,5	0	7,5
L.0	100	0	0	79	1,5	19	0	24
L.1	100	0	0	92,5	1	6	0	7
L.2	100	0	0	94	4	2	0	5
NM	100	0	0	100	0	0	0	0

**Tabla 19. Intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno Lewis x en función de la variable lesión histológica 2.** 0BL=i negativa estrato basal, 1BL=i leve estrato basal, 2BL=i moderada/fuerte estrato basal, 0SB= i negativa estrato suprabasal, 1SB=i leve estrato suprabasal, 2SB=i moderada/fuerte estrato suprabasal, A.0=área adyacente a COCE Sin D, A.1= área adyacente a COCE Con D Bajo grado, A.2= área adyacente a COCE Con D Alto grado, C=COCE, L.0=leucoplasia Sin D, L.1= leucoplasia Con D Bajo grado, L.2= leucoplasia Con D Alto grado, NM=control. Se expresa el número de células en forma de %. N Lewis x: A.0=12, A.1=15, A.2=7, C=20, L.0=13, L.1=9, L.2=6, NM=21.

### 3.5.2. Resultados del análisis comparativo de patrones de expresión específicos del antígeno Lewis x en función de la variable lesión histológica 1:

- **Tinción Horizontal:** de las lesiones que expresaron le<sup>x</sup>, el patrón más frecuente de tinción fue FP(34%). Existen DES al comparar la expresión de dicho patrón en los C y las L, que fue muy notable, con los controles. En general las L expresaron más tinción de lo esperado y los controles menos tinción de lo esperado (p=0,001). *Ver Tabla 7.*
- **Tinción Vertical:** todas las lesiones que se tiñeron expresaron le<sup>x</sup> en el estrato SB, y ninguna en el estrato B, no existiendo DES entre los grupos. *Ver Tabla 8.*
- **Localización intracelular de la tinción:** todos los casos que mostraron expresión positiva de le<sup>x</sup>, a excepción de 1, mostraron tinción MB, ese caso mostró tinción CMB. Los C mostraron más tinción de lo esperado (CMB), las L más tinción en general (MB)



de lo esperado, y los NM menos tinción en general de lo esperado ( $p=0,001$ ). Ver Tabla 20.

	LEWIS x				LEWIS y			
	A	C	L	NM	A	C	L	NM
MB	35	50	57	0	53	35	43	21
CMB	0	0	4	0	18	10	7	74
CMBN	0	5	0	0	9	35	18	0
MBN	9	0	4	0	18	20	29	0
NT	56	45	36	100	3	0	4	5

**Tabla 20. % de casos que expresan tinción con los antígenos Lewis x e y en una determinada localización intracelular.** A=Área adyacente a COCE, C=COCE, L=Leucoplasia, NM= Mucosa Normal. MB=Membrana, CMB= Citoplasma y Membrana, CMBN= Citoplasma, Membrana y Núcleo, Membrana y Núcleo, NT= No Tinción. N Lewis x: A=34, C=20, L=28,NM=21; Lewis y: A=34, C=20, L=28,NM=19.

### 3.5.3. Resultados del análisis de la influencia de determinadas variables en la expresión dicotómica de la tinción del antígeno Lewis x:

Al analizar la influencia de las variables a estudio en la posible expresión del antígeno Lewis x, mediante el análisis dicotómico, no se detectan resultados estadísticamente significativos con alguna de las variables a estudio.

## 3.6. LEWIS y:

### 3.6.1.Resultados del análisis de intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno Lewis y:

En el *estrato basal* el antígeno le<sup>y</sup> se expresó en un % muy bajo de células en el grupo NM, 0%, y en las A, 19%, con intensidad variable entre leve y moderada/fuerte. El grupo C fue el que más tinción mostró, un 55% de las células, seguida del grupo L, con un 27% de las células teñidas, siendo la intensidad principalmente moderada/fuerte. Hubo DES( $p=0$ ) al comparar el grupo C con el resto de los grupos, tanto en el análisis de intensidad como en el porcentaje total de células, y al comparar el grupo L con el grupo NM en el análisis de intensidad. En el análisis teniendo en cuenta el grado de displasia, se detectan DES( $p=0$ ) al comparar el grupo C, grupo que mostró más tinción, específicamente con los grupos A.0, A.1 y NM que fueron los grupos que mostraron menor tinción tanto en el análisis de intensidad como en el porcentaje total de células.

En el *estrato suprabasal* la tinción fue bastante marcada en los 4 grupos, alcanzando valores de más del 70% de células teñidas con una intensidad principalmente moderada/fuerte y sin DES entre los grupos. En el análisis teniendo en cuenta el grado

de displasia epitelial se observan más ó menos los mismos resultados sin DES al comparar todos los grupos. *Ver Tablas 21 y 22.*

	0BL	1BL	2BL	0SB	1SB	2SB	% BL	% SB
A	87	6	7	27,5	3	70	19	72,5
C	45	0	55	21	0	79	55	79
L	69	6	26	19	11	69	27	77
NM	100	0	0	12	0	88	0	80

**Tabla 21. Intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno Lewis y en función de la variable lesión histológica 1.** 0BL=i negativa estrato basal, 1BL=i leve estrato basal, 2BL=i moderada/fuerte estrato basal, 0SB= i negativa estrato suprabasal, 1SB=i leve estrato suprabasal, 2SB=i moderada/fuerte estrato suprabasal, A=área adyacente a COCE, C=COCE, L=Leucoplasia, NM=control. Se expresa el número de células en forma de %. Lewis y: A=34, C=20, L=28,NM=19.

	0BL	1BL	2BL	0SB	1SB	2SB	% BL	% SB
A.0	92	8	0	37	8	55	17	63
A.1	93	0	7	26	0	74	14	74
A.2	67	14	18,5	14	0	86	33	86
C	45	0	55	21	0	79	55	79
L.0	71	6	23	26,5	18	54	21,5	72
L.1	74	0	25,5	5,5	10	84	25,5	94
L.2	55	13	32	23	0	77	38,5	66
NM	100	0	0	12	0	88	0	80

**Tabla 22. Intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno Lewis y en función de la variable lesión histológica2.** 0BL=i negativa estrato basal, 1BL=i leve estrato basal, 2BL=i moderada/fuerte estrato basal, 0SB= inegativa estrato suprabasal, 1SB=i leve estrato suprabasal, 2SB=i moderada/fuerte estrato suprabasal, A.0=área adyacente a COCE Sin D, A.1= área adyacente a COCE Con D Bajo grado, A.2= área adyacente a COCE Con D Alto grado, C=COCE, L.0=leucoplasia Sin D, L.1= leucoplasia Con D Bajo grado, L.2= leucoplasia Con D Alto grado, NM=control. Se expresa el número de células en forma de %. Lewis y: A.0=12, A.1=15, A.2=7, C=20, L.0=13, L.1=9, L.2=6, NM=19.

### 3.6.2. Resultados del análisis comparativo de patrones de expresión específicos del antígeno Lewis y en función de la variable lesión histológica 1:

- **Tinción Horizontal:** de las lesiones que expresaron le<sup>y</sup>, el patrón más frecuente de tinción fue DC(66%), no existiendo DES entre los grupos. *Ver Tabla 6.*
- **Tinción Vertical:** de la gran cantidad de lesiones que se tiñeron, la mayoría expresaron le<sup>y</sup> en el estrato SB(64,2%), y el resto en los estratos B y SB. Destacan los C por mayor tinción BSB y los controles por mayor tinción SB (p=0,001). *Ver Tabla 7.*

- **Localización intracelular de la tinción:** la mayoría de los casos mostraron tinción para el le<sup>y</sup>. La localización fue bastante variable, desde sólo MB en 41 casos, CMB en 24 casos, NMB en 18 casos y CNM en 15 casos. Los C expresaron mayor localización en CNMB, las L expresaron tinción MB y los controles CMB (p=0). *Ver Tabla 20.*

### 3.6.3. Resultados del análisis de la influencia de determinadas variables en la expresión dicotómica de la tinción del antígeno Lewis y:

Al analizar la influencia de las variables a estudio en la posible expresión del antígeno Lewis y, mediante el análisis dicotómico, se detectan los siguientes resultados estadísticamente significativos:

- Variable *localización anatómica*: DES al comparar el % de lesiones procedentes de D que expresan le<sup>y</sup> (80%) con el % de lesiones provenientes de L(100%), NQ (97%) y Q(100%) que también expresaron le<sup>y</sup> (p=0,007). *Ver tabla 23.*
- Resto de las variables: no se observan DES.

	G. A	G. B	Le a	Le b	Le x	Le y	hsp27	hsp60	hsp70	hsp90
D	80	20	10	40	20	80	100	90	80	40
L	33	0	29	57	49,6	100	100	57	65	0
NQ	53	19	25	28	47	97	97	56	56	6
Q	42	13	13	32	32	100	100	74	66	42

**Tabla 23. Análisis dicotómico de la expresión de los antígenos en función de la variable localización anatómica.** G.A=Grupo A, G.B=Grupo B, Le a=Lewis a, Le b=Lewis b, Le x=Lewis x, Le y= Lewis y, D= Dorso lingual, L= Borde lateral lingual, NQ= mucosa no queratinizada, Q= encía queratinizada. Se expresan los casos en forma de %. N Grupo A: D=10, L=24, NQ=32, Q=38; N Grupo B: D=10, L=24, NQ=32, Q=38; N Lewis a: D=10, L=24, NQ=32, Q=38; N Lewis b: D=10, L=23, NQ=32, Q=38; N Lewis x: D=10, L=23, NQ=32, Q=38; Lewis y: D=10, L=23, NQ=32, Q=36; N hsp27: D=9, L=23, NQ=32, Q=38; N hsp60: D=10, L=23, NQ=32, Q=38; N hsp70: D=10, L=23, NQ=32, Q=38; N hsp90: D=10, L=23, NQ=32, Q=38.

## 3.7. Hsp27:

### 3.7.1.Resultados del análisis de intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno hsp27:

En el *estrato basal* el antígeno *hsp27* se expresó en el 95% de las células del grupo NM y en más del 60% de las células en los otros 3 grupos de estudio, siendo la intensidad principalmente moderada/fuerte. Hubo DES(p=0) al comparar el grupo NM con los grupos A y L en el análisis de intensidad moderada/fuerte, ya que en el grupo

NM la intensidad fue mayor. Sin embargo, al hacer la subdivisión teniendo en cuenta el grado de displasia epitelial, no se observan DES entre los grupos, si bien destacar que el grupo L.2 expresó menos del 55% de células teñidas.

En el *estrato suprabasal* la tinción también fue muy marcada, alcanzando valores de más del 80% de las células en todos los grupos, e incluso del 100% en el grupo NM con una intensidad principalmente moderada/fuerte. Nuevamente hubo DES( $p=0$ ) al comparar el grupo NM con los grupos A y L en el análisis de intensidad moderada/fuerte. En el análisis teniendo en cuenta el grado de displasia epitelial, se detectan DES( $p=0,01$ ) al comparar específicamente y tan sólo en el análisis de intensidad moderada/fuerte, el grupo NM con un 100% de células teñidas con intensidad moderada/fuerte y el grupo A.1 con un 63% de células teñidas con esa misma intensidad. Ver Tablas 24 y 25.

	0BL	1BL	2BL	0SB	1SB	2SB	% BL	% SB
A	30	5	64	15	15	70	70	85
C	24,5	6	69,5	12	5,5	82,5	75,5	88
L	27	12	60	14	9	78	72	84
NM	5	0	95	0	0	100	90	95

**Tabla 24. Intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno hsp27 en función de la variable lesión histológica 1.** 0BL=i negativa estrato basal, 1BL=i leve estrato basal, 2BL=i moderada/fuerte estrato basal, 0SB= i negativa estrato suprabasal, 1SB=i leve estrato suprabasal, 2SB=i moderada/fuerte estrato suprabasal, A=área adyacente a COCE, C=COCE, L=Leucoplasia, NM=control. Se expresa el número de células en forma de %. N hsp27: A=34, C=20, L=28, NM=20.

	0BL	1BL	2BL	0SB	1SB	2SB	% BL	% SB
A.0	28	4	68	9	18	72,5	72	91
A.1	35	5	59	21	16	63	64,5	79
A.2	24	7	68,5	13	7	80	76	87
C	24,5	6	69,5	12	5,5	82,5	75,5	88
L.0	32	11	57	12	9	79	68	88
L.1	14	18	68	5,5	12	82	90	95,5
L.2	37	7	57	29	3	67,5	54	61
NM	5	0	95	0	0	100	95	100

**Tabla 25. Intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno hsp27 en función de la variable lesión histológica 2.** 0BL=i negativa estrato basal, 1BL=i leve estrato basal, 2BL=i moderada/fuerte estrato basal, 0SB= i negativa estrato suprabasal, 1SB=i leve estrato suprabasal, 2SB=i moderada/fuerte estrato suprabasal, A.0=área adyacente a COCE Sin D, A.1= área adyacente a COCE Con D Bajo grado, A.2= área adyacente a COCE Con D Alto grado, C=COCE, L.0=leucoplasia Sin D, L.1= leucoplasia Con D Bajo grado, L.2= leucoplasia Con D Alto grado, NM=control. Se expresa el número de células en forma de %. N hsp27: A.0=12, A.1=15, A.2=7, C=20, L.0=13, L.1=9, L.2=6, NM=20.

### 3.7.2. Resultados del análisis comparativo de patrones de expresión específicos del antígeno hsp27 en función de la variable *lesión histológica 1*:

- **Tinción Horizontal:** Hubo bastante tinción con este antígeno. El patrón más frecuente de tinción fue DC(81,1%). Haciendo una comparativa entre los grupos, las L destacaron por expresar el patrón FC y los NM el DC ( $p=0,035$ ). *Ver Tabla 26.*

	Hsp27				Hsp60				Hsp70				Hsp90			
	A	C	L	NM	A	C	L	NM	A	C	L	NM	A	C	L	NM
DC	79	95	71	100	0	25	0	95	6	20	11	90	0	0	0	100
DP	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC	0	0	18	0	0	5	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FP	15	5	11	0	47	55	39	5	53	30	43	10	0	5	0	0
NT	3	0	0	0	53	15	50	0	41	50	46	0	100	95	100	0

**Tabla 26. % de casos que expresan un determinado patrón de tinción Horizontal con las proteínas de choque térmico.** A=Área adyacente a COCE, C=COCE, L=Leucoplasia, NM= Mucosa Normal. DC=Difuso Completo, DP= Difuso Parcheado, FC= Focal Completo, FP= Focal Parcheado, NT= No Tinción. N hsp27: A=34, C=20, L=28,NM=20; N hsp60: A=34, C=20, L=28,NM=21; N hsp70: A=34, C=20, L=28,NM=21; N hsp90: A=34, C=20, L=28,NM=21.

- **Tinción Vertical:** de las lesiones que se tiñeron, la mayoría expresaron *hsp27* en el estrato B y SB(85,8%), y resto en el estrato SB exclusivamente, no existiendo DES entre los grupos. *Ver tabla 27.*

	Hsp27				Hsp60				Hsp70				Hsp90			
	A	C	L	NM	A	C	L	NM	A	C	L	NM	A	C	L	NM
B	0	0	0	0	41	45	21	0	50	10	46	5	0	0	0	0
SB	15	10	7	5	3	5	14	0	0	10	0	0	0	5	0	0
BSB	82	90	93	95	3	35	14	100	9	30	7	95	0	0	0	0
NT	3	0	0	0	53	15	50	0	41	50	46	0	100	95	100	100

**Tabla 27. % de casos que expresan un determinado patrón de tinción Vertical con las Proteínas de choque térmico.** A=Área adyacente a COCE, C=COCE, L=Leucoplasia, NM= Mucosa Normal. B=Estrato Basal, SB=Estrato Suprabasal, BSB= Estrato Basal y Suprabasal, NT= No Tinción. N hsp27: A=34, C=20, L=28,NM=20; N hsp60: A=34, C=20, L=28,NM=21; N hsp70: A=34, C=20, L=28,NM=21; N hsp90: A=34, C=20, L=28,NM=21.

- **Localización intracelular de la tinción:** la tinción fue variable. La mayoría de los casos que mostraron expresión de *hsp27* fue C (65 casos), 31 casos mostraron tinción CMB, 4 casos en CN y 1 caso en CNMB. Las L mostraron mayor tinción CMB y los NM mayor tinción exclusivamente C ( $p=0,020$ ). *Ver Tabla 28.*

	Hsp27				Hsp60				Hsp70				Hsp90			
	A	C	L	NM	A	C	L	NM	A	C	L	NM	A	C	L	NM
<b>C</b>	59	60	46	100	47	80	50	100	0	0	0	0	0	5	0	100
<b>N</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>CMB</b>	32	30	50	0	0	5	0	0	50	25	14	95	0	0	0	0
<b>CN</b>	6	10	0	0	0	0	0	0	9	25	39	5	0	0	0	0
<b>CMBN</b>	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>NT</b>	3	0	0	0	53	15	50	0	41	50	46	0	100	95	100	0

**Tabla 28. % de casos que expresan tinción con los antígenos de las proteínas de choque térmico en una determinada localización intracelular.** A=Área adyacente a COCE, C=COCE, L=Leucoplasia, NM= Mucosa Normal. C=Citoplasma, N=Núcleo, CMB= Citoplasma y Membrana, CN=Citoplasma y Núcleo, CMBN= Citoplasma, Membrana y Núcleo, NT= No Tinción. N hsp27: A=34, C=20, L=28,NM=20; N hsp60: A=34, C=20, L=28,NM=21; N hsp70: A=34, C=20, L=28,NM=21; N hsp90: A=34, C=20, L=28,NM=21.

### 3.7.3. Resultados del análisis de la influencia de determinadas variables en la expresión dicotómica de la tinción del antígeno hsp27:

Al analizar la influencia de las variables a estudio en la posible expresión del antígeno *hsp27*, mediante el análisis dicotómico, no se detectan resultados estadísticamente significativos con alguna de las variables a estudio.

## 3.8. Hsp60:

### 3.8.1.Resultados del análisis de intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno hsp60:

En el *estrato basal* el antígeno *hsp60* se expresó en un % muy bajo de células en las A,11%, y en las L,21%, aumentando su expresión en los C, 56,5% y en los NM, 95%, oscilando las intensidades de leve a moderada/fuerte. Se observaron DES( $p=0$ ) tanto en el análisis de intensidad leve, al comparar el grupo NM, donde la mitad de las células que expresaron el antígeno lo hicieron con intensidad leve, con los otros 3 grupos, en el análisis de intensidad moderada, entre los grupos NM y C al compararlos con el grupo A y en el análisis del porcentaje total de células, al comparar el grupo NM con los otros 3 grupos y al comparar el grupo C con los grupos A y L.

En el análisis teniendo en cuenta el grado de displasia epitelial también hubo DES( $p=0$ ) en el análisis de intensidad leve, al comparar el grupo NM, ya que la mitad de las células que mostraron expresión del antígeno *hsp60* lo hicieron con intensidad leve, y el resto de los grupos, en el análisis de intensidad moderada/fuerte, las DES se detectaron entre el grupo L.0, con tan sólo un 2% de células teñidas con esta intensidad, y los grupos C y NM y nuevamente en el porcentaje total de células, hubo DES entre el

grupo C y las tres categorías del grupo A , el grupo L.0 y el grupo NM y entre el grupo NM y el resto de los grupos.

En el *estrato suprabasal* la tinción fue menos marcada en general a excepción del grupo NM que expresó un 95% de las células teñidas aunque la intensidad fue principalmente **leve**. Hubo DES( $p=0$ ) al comparar el grupo NM con los otros 3 grupos en el análisis de intensidad leve y en análisis de intensidad moderada/fuerte al comparar los grupos A y C, ya que el grupo C expresó un 23,5% de células teñidas con esta intensidad frente a un 2% expresado por el grupo A. Asimismo en el porcentaje total de células se encuentran DES al comparar el grupo NM con los otros 3 grupos y el grupo C con el grupo A. En el análisis teniendo en cuenta el grado de displasia epitelial nuevamente se encuentran DES en este estrato al comparar el grupo NM y el resto de los grupos tanto en el análisis de intensidad leve como en el porcentaje total de células. Ver Tablas 29 y 30.

	0BL	1BL	2BL	0SB	1SB	2SB	% BL	% SB
A	88	3	9	96	2	2	11	4
C	38,5	14,5	47	68,5	8	23,5	56,5	29
L	78	0	22	95	0	5	21	11
NM	5	48	48	5	77	18	95	95

**Tabla 29. Intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno hsp60 en función de la variable lesión histológica 1.** 0BL=i negativa estrato basal, 1BL=i leve estrato basal, 2BL=i moderada/fuerte estrato basal, 0SB= i negativa estrato suprabasal, 1SB=i leve estrato suprabasal, 2SB=i moderada/fuerte estrato suprabasal, A=área adyacente a COCE, C=COCE, L=Leucoplasia, NM=control. Se expresa el número de células en forma de %. N hsp60: A=34, C=20, L=28,NM=21.

	0BL	1BL	2BL	0SB	1SB	2SB	% BL	% SB
A.0	90	4	6	92	4	4	10	8
A.1	85	4	11	98	2	0	15	2
A.2	91	0	9	99	0	1	2	1
C	38,5	14,5	47	68,5	8	23,5	56,5	29
L.0	95	0	5	98	0	2	5	1
L.1	58	0	42	93	0	7	42	18
L.2	72	0	28	93	0	7	24	20
NM	4,5	48	48	5	77	18	95,5	95

**Tabla 30. Intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno hsp60 en función de la variable lesión histológica 2.** 0BL=i negativa estrato basal, 1BL=i leve estrato basal, 2BL=i moderada/fuerte estrato basal, 0SB= i negativa estrato suprabasal, 1SB=i leve estrato suprabasal, 2SB=i moderada/fuerte estrato suprabasal, A.0=área adyacente a COCE Sin D, A.1= área adyacente a COCE Con D Bajo grado, A.2= área adyacente a COCE

Con D Alto grado, C=COCE, L.0=leucoplasia Sin D, L.1= leucoplasia Con D Bajo grado, L.2= leucoplasia Con D Alto grado, NM=control. Se expresa el número de células en forma de %. N hsp60: A.0=12, A.1=15, A.2=7, C=20, L.0=13, L.1=9, L.2=6, NM=21.

### **3.8.2. Resultados del análisis comparativo de patrones de expresión específicos del antígeno hsp60 en función de la variable *lesión histológica 1*:**

- **Tinción Horizontal:** los dos patrones de tinción más frecuentes fueron FP(36,8%) y DC(23,6%). Haciendo una comparativa entre los grupos, las A y las L se tiñen muy poco, este último grupo sobretodo siguiendo el patrón FC y los C y los NM más de lo esperado, este último grupo sobretodo DC ( $p=0$ ). *Ver Tabla 26.*
- **Tinción Vertical:** la tinción fue variable. De las lesiones que se tiñeron, destaca la expresión BSB(31,1%) y la exclusivamente B(27,4%). Haciendo una comparativa entre los grupos, las A y las L mostraron menor tinción de lo esperado, las primeras en B y las segundas en SB. Los C y los NM mayor tinción de lo esperado, destacando este último grupo por una mayor expresión en BSB( $p=0$ ). *Ver Tabla 27.*
- **Localización intracelular de la tinción:** todos los casos que mostraron expresión positiva de *hsp60*, a excepción de 1, mostraron tinción C, ese caso mostró tinción CMB y fue un COCE. *Ver tabla 28.*

### **3.8.3. Resultados del análisis de la influencia de determinadas variables en la expresión dicotómica de la tinción del antígeno hsp60:**

Al analizar la influencia de las variables a estudio en la posible expresión del antígeno *hsp60*, mediante el análisis dicotómico, se detectan los siguientes resultados estadísticamente significativos:

- Variable *lesión clínica*: se observa que el 100% de los CE y de los NM, el 93% de los CU, el 69% de las LNH, el 29% de las LH y ningún caso de los CM expresaron *hsp60*. Hubo DES al comparar los CM con los CE, los CU y los NM, y al comparar los CE y los CU con las LH y los NM con las LH y con las LNH (DES,  $p=0,000$ ). *Ver tabla 31.*
- Resto de las variables: no se observan DES.



	G. A	G. B	Le a	Le b	Le x	Le y	hsp27	hsp60	hsp70	hsp90
CE	0	0	33	67	100	100	100	100	67	33
CM	0	0	0	50	0	100	100	0	0	0
CU	20	7	27	27	53	100	100	93	53	0
LH	64	7	21	43	75	93	100	29	71	0
LNH	53	6	24	38	75	100	100	69	31	0
NM	52	24	5	19	0	95	100	100	100	100

**Tabla 31. Análisis dicotómico de la expresión de los antígenos en función de la variable lesión clínica.** G.A=Grupo A, G.B=Grupo B, Le a=Lewis a, Le b=Lewis b, Le x=Lewis x, Le y= Lewis y, CE= Carcinoma Exofítico, CM= Carcinoma Mixto, CU= Carcinoma Ulcerado, L= Leucoplasia Homogénea, LNH= Leucoplasia No Homogénea, NM= Control. Se expresan los casos en forma de %. N Grupo A: CE=3, CM=2, CU=15, LH=14, LNH=17, NM=21; N Grupo B: CE=3, CM=2, CU=15, LH=14, LNH=17, NM=21; N Lewis a: CE=3, CM=2, CU=15, LH=14, LNH=17, NM=21; N Lewis b: CE=3, CM=2, CU=15, LH=14, LNH=16, NM=21; N Lewis x: CE=3, CM=2, CU=15, LH=14, LNH=16, NM=21; Lewis y: CE=3, CM=2, CU=15, LH=14, LNH=16, NM=19; N hsp27: CE=3, CM=2, CU=15, LH=14, LNH=16, NM=20; N hsp60: CE=3, CM=2, CU=15, LH=14, LNH=16, NM=21; N hsp70: CE=3, CM=2, CU=15, LH=14, LNH=16, NM=21; N hsp90: CE=3, CM=2, CU=15, LH=14, LNH=16, NM=21.

### 3.9. Hsp70:

#### 3.9.1.Resultados del análisis de intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno hsp70:

En el *estrato basal* el antígeno *hsp70* se expresó en un mayor % de células en el grupo NM (99%) en comparación con un % de células teñidas en torno al 20% en los otros tres grupos, siendo la intensidad principalmente moderada/fuerte en los 4 grupos. Hubo DES( $p=0$ ) al comparar el grupo NM con los otros tres grupos tanto en el análisis de intensidad moderada/fuerte como en el % total de células teñidas en el estrato basal. En el análisis teniendo en cuenta el grado de displasia epitelial, se detectan los mismos resultados estadísticamente significativos ( $p=0$ ) al comparar nuevamente el grupo NM con el resto de los grupos tanto en el análisis de intensidad moderada como en el porcentaje total de células.

En el *estrato suprabasal* nuevamente la tinción fue muy marcada en el grupo NM, 95,5% de las células teñidas, seguido del grupo C con un 24% de las células teñidas y finalmente por los grupos A y L con <10% de las células teñidas. Hubo DES ( $p=0$ ) al comparar el grupo NM con los otros tres grupos tanto en el análisis de intensidad leve como moderada/fuerte y en el análisis del % total de células, existiendo en este último análisis también DES( $p=0$ ) al comparar el grupo C con el grupo A. En el análisis teniendo en cuenta el grado de displasia epitelial, se detectan DES( $p=0$ ) al comparar

nuevamente el grupo NM, con el resto de los grupos tanto en el análisis de intensidad moderada como en el porcentaje total de células. *Ver tablas 32 y 33.*

	0BL	1BL	2BL	0SB	1SB	2SB	% BL	% SB
A	77	3	20	97	0	3	23	3
C	75	2	23	76	2	22	25	24
L	76	4	20	92	3	5	25	8
NM	1	0	99	5	19	76	99	95,5

**Tabla 32. Intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno hsp70 en función de la variable lesión histológica 1.** 0BL=i negativa estrato basal, 1BL=i leve estrato basal, 2BL=i moderada/fuerte estrato basal, 0SB= i negativa estrato suprabasal, 1SB=i leve estrato suprabasal, 2SB=i moderada/fuerte estrato suprabasal, A=área adyacente a COCE, C=COCE, L=Leucoplasia, NM=control. Se expresa el número de células en forma de %. N hsp70: A=34, C=20, L=28,NM=21.

	0BL	1BL	2BL	0SB	1SB	2SB	% BL	% SB
A.0	77	1	22,5	99	1	0	23	1
A.1	74	6	20	100	0	0	26	0
A.2	83	0	17	86	0	14	17	14
C	75	2	23	76	2	22	25	24
L.0	64	8,5	27	90	6	4	36	10
L.1	80	0	20	89	0	11	20	11
L.2	97	0	3	100	0	0	11	0
NM	1	0	99	4,5	19	76	99	95,5

**Tabla 33. Intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno hsp70 en función de la variable lesión histológica 2.** 0BL=i negativa estrato basal, 1BL=i leve estrato basal, 2BL=i moderada/fuerte estrato basal, 0SB= i negativa estrato suprabasal, 1SB=i leve estrato suprabasal, 2SB=i moderada/fuerte estrato suprabasal, A.0=área adyacente a COCE Sin D, A.1= área adyacente a COCE Con D Bajo grado, A.2= área adyacente a COCE Con D Alto grado, C=COCE, L.0=leucoplasia Sin D, L.1= leucoplasia Con D Bajo grado, L.2= leucoplasia Con D Alto grado, NM=control. Se expresa el número de células en forma de %. N hsp70: A.0=12, A.1=15, A.2=7, C=20, L.0=13, L.1=9, L.2=6, NM=21.

### 3.9.2. Resultados del análisis comparativo de patrones de expresión específicos del antígeno hsp70 en función de la variable lesión histológica 1:

- **Tinción Horizontal:** de las lesiones que expresaron *hsp70*, sólo hubo dos patrones de tinción, FP(35,8%) y DC(26,4%). Haciendo una comparativa entre los grupos, las A destacan por su expresión del patrón FP, los NM por su mayor tinción general, sobretodo siguiendo el patrón DC(p=0). *Ver Tabla 26.*

- **Tinción Vertical:** de las lesiones que se tiñeron, destacaron dos tipos de expresión, sólo en el estrato B(31,1%) y la expresión BSB(29,2%). Las A destacan por expresar

más en B, los C más en SB y los NM por expresar más tinción en general, sobretodo BSB(p=0). *Ver tabla 27.*

- **Localización intracelular de la tinción:** 32 casos mostraron tinción CN y 34 casos sólo N. Las A destacan por mostrar la tinción sobretodo en N y los NM en CN(p=0). *Ver tabla 28.*

### **3.9.3. Resultados del análisis de la influencia de determinadas variables en la expresión dicotómica de la tinción del antígeno hsp70:**

Al analizar la influencia de las variables a estudio en la posible expresión del antígeno *hsp70*, mediante el análisis dicotómico, se detectan los siguientes resultados estadísticamente significativos:

- Variable *lesión clínica*: hubo DES al comparar los NM (100% de los controles expresaron *hsp70*) con CM(0% expresaron *hsp70*), CU(53% expresaron *hsp70*) y LNH(31% expresaron *hsp70*). *Ver Tabla 31.*
- Resto de las variables: no se observan DES.

### **3.10. Hsp90:**

#### **3.10.1.Resultados del análisis de intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno hsp90:**

En el *estrato basal* el antígeno *hsp90* se expresó en un % muy alto en el grupo NM, un 100% de células teñidas con intensidad principalmente moderada/fuerte, en comparación con la nula tinción en los otros tres grupos. Hubo DES(p=0) al comparar el grupo NM con los otros tres grupos tanto en el análisis de intensidad leve y moderada/fuerte como en el % total de células teñidas. En el análisis teniendo en cuenta el grado de displasia epitelial, se observan prácticamente los mismos resultados hallándose DES(p=0) al comparar el grupo NM con los otros grupos, tanto en el análisis de intensidad moderada/fuerte como en el porcentaje total de células.

En el *estrato suprabasal* ocurrió exactamente lo mismo que en el estrato basal, existiendo asimismo DES (p=0) al comparar el grupo NM con los otros tres grupos tanto en el análisis de intensidad leve y moderada/fuerte como en el % total de células teñidas. En el análisis teniendo en cuenta el grado de displasia epitelial se observan asimismo DES(p=0) al comparar el grupo NM con los otros grupos tanto en el análisis de intensidad leve y moderada/fuerte como en el porcentaje de células. *Ver Tablas 34 y 35.*

	0BL	1BL	2BL	0SB	1SB	2SB	% BL	% SB
A	100	0	0	100	0	0	0	0
C	100	0	0	99,5	0	0	0	0
L	100	0	0	100	0	0	0	0
NM	100	12	88	1	60	40	100	100

**Tabla 34. Intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno hsp90 en función de la variable lesión histológica 1.** 0BL=i negativa estrato basal, 1BL=i leve estrato basal, 2BL=i moderada/fuerte estrato basal, 0SB= i negativa estrato suprabasal, 1SB=i leve estrato suprabasal, 2SB=i moderada/fuerte estrato suprabasal, A=área adyacente a COCE, C=COCE, L=Leucoplasia, NM=control. Se expresa el número de células en forma de %. N hsp90: A=34, C=20, L=28,NM=21.

	0BL	1BL	2BL	0SB	1SB	2SB	% BL	% SB
A.0	100	0	0	100	0	0	0	0
A.1	100	0	0	100	0	0	0	0
A.2	100	0	0	100	0	0	0	0
C	100	0	0	99,5	0	0,5	0	0,5
L.0	100	0	0	100	0	0	0	0
L.1	100	0	0	100	0	0	0	0
L.2	100	0	0	100	0	0	0	0
NM	0,5	12	88	1	59	40	99,5	99

**Tabla 35. Intensidad y porcentaje de células teñidas con el antígeno hsp90 en función de la variable lesión histológica 2.** 0BL=i negativa estrato basal, 1BL=i leve estrato basal, 2BL=i moderada/fuerte estrato basal, 0SB= i negativa estrato suprabasal, 1SB=i leve estrato suprabasal, 2SB=i moderada/fuerte estrato suprabasal, A.0=área adyacente a COCE Sin D, A.1= área adyacente a COCE Con D Bajo grado, A.2= área adyacente a COCE Con D Alto grado, C=COCE, L.0=leucoplasia Sin D, L.1= leucoplasia Con D Bajo grado, L.2= leucoplasia Con D Alto grado, NM=control. Se expresa el número de células en forma de %. N hsp90: A.0=12, A.1=15, A.2=7, C=20, L.0=13, L.1=9, L.2=6, NM=21.

### 3.10.2. Resultados del análisis comparativo de patrones de expresión específicos del antígeno hsp90 en función de la variable lesión histológica 1:

- **Tinción H:** de las lesiones que expresaron *hsp90*, el patrón más frecuente de tinción fue DC(19,8%). Haciendo una comparativa entre los grupos, las A y las L mostraron menor tinción con muy poca expresión del patrón DC. Los C y los NM mayor tinción FP en el caso de los primeros y DC en el caso de los segundos(p=0). Ver Tabla 26.
- **Tinción V:** de las lesiones que se tiñeron (NM), la mayoría expresaron *hsp90* en BSB(19,8%), y sólo un caso exclusivamente en el SB. Ver Tabla 27.
- **Localización de la tinción:** todos los casos que expresaron tinción de *hsp90* tuvieron una tinción C. Ver Tabla 28.

### 3.10.3. Resultados del análisis de la influencia de determinadas variables en la expresión dicotómica de la tinción del antígeno hsp90:

Al analizar la influencia de las variables a estudio en la posible expresión del antígeno *hsp90*, mediante el análisis dicotómico, se detectan los siguientes resultados estadísticamente significativos:

- Variable *otras enfermedades sistémicas*: un 76% de las lesiones que pertenecían a pacientes con enfermedades sistémicas expresaron dicho antígeno en comparación con un 44% de lesiones que pertenecían a pacientes sin enfermedades sistémicas ( $p=0,000$ ). Ver Tabla 36.

- Variable *tabaco*: al comparar un 3% de las lesiones que pertenecían a F y expresaron hsp90 con un 35% de las lesiones que pertenecían a NF y expresaron dicho antígeno( $p=0,001$ ). Ver Tabla 10.

- Variable *alcohol*: un 29% de las lesiones que pertenecen a pacientes no consumidores expresan hsp90 frente a tan sólo un 3% de los pacientes que sí consumían ( $p=0,001$ ). Ver Tabla 15.

- Variable *localización anatómica*: hay DES al comparar el % de lesiones procedentes de D que expresan *hsp90*(40%) con el 0% de lesiones procedentes de L que expresan *hsp90* y al comparar el % de lesiones procedentes de Q que expresan *hsp90* (42%) con el % de lesiones procedentes de L(0%) y NQ (6%) que también expresan hsp90 ( $p=0,000$ ). Ver Tabla 23.

- Variable *tumor previo*: se observa que un 29% de las lesiones que pertenecían a pacientes que no habían tenido tumores previos expresaban *hsp90* frente a un 6% de los pacientes que sí habían tenido tumores previos (DES,  $p=0,006$ ). Ver Tabla 37.

- Variable *tumor posterior*: se observa que un 36% de las lesiones que pertenecían a pacientes que no desarrollaron tumores posteriores expresaban *hsp90* frente a un 2% de las lesiones que pertenecían a pacientes que sí desarrollaron tumores posteriores (DES,  $p=0,000$ ). Ver Tabla 38.

- Resto de las variables: no se observan DES.

	G. A	G. B	Le a	Le b	Le x	Le y	hsp27	hsp60	hsp70	hsp90
NO	46	8	12	36	42	96	100	72	72	44
SI	46	13	24	38	50	97	99	63	61	12

**Tabla 36. Análisis dicotómico de la expresión de los antígenos en función de la variable otras enfermedades sistémicas.** G.A=Grupo A, G.B=Grupo B, Le a=Lewis a, Le b=Lewis b, Le x=Lewis x, Le y= Lewis y, No= No enfermedades sistémicas concomitantes, Si= Si enfermedades sistémicas concomitantes. Se expresan los casos en forma de %. N Grupo A: NO=26, SI=76; N Grupo B: NO=26, SI=76; N Lewis a: NO=26, SI=76; N Lewis b: NO=25, SI=76 ; N Lewis x: NO=25, SI=76; Lewis y: NO=24, SI=75; N hsp27: NO=25, SI=76; N hsp60: NO=25, SI=76; N hsp70: NO=25, SI=76; N hsp90: NO=25, SI=76.

	G. A	G. B	Le a	Le b	Le x	Le y	hsp27	hsp60	hsp70	hsp90
NO	52	13	22	38	19	98	100	68	68	29
SI	35	12	18	35	41	94	97	65	56	6

**Tabla 37. Análisis dicotómico de la expresión de los antígenos en función de la variable tumor previo.** G.A=Grupo A, G.B=Grupo B, Le a=Lewis a, Le b=Lewis b, Le x=Lewis x, Le y= Lewis y, No= No tumor previo, Si= Si tumor previo. Se expresan los casos en forma de %. N Grupo A: NO=69, SI=34; N Grupo B: NO=69, SI=34; N Lewis a: NO=69, SI=34; N Lewis b: NO=68, SI=34 ; N Lewis x: NO=68, SI=34; Lewis y: NO=66, SI=34; N hsp27: NO=67, SI=34; N hsp60: NO=68, SI=34; N hsp70: NO=68, SI=34; N hsp90: NO=68, SI=34.

	G. A	G. B	Le a	Le b	Le x	Le y	hsp27	hsp60	hsp70	hsp90
NO	42	13	18	34	20	96	100	68	64	36
SI	50	12	23	42	53	98	98	65	63	2

**Tabla 38. Análisis dicotómico de la expresión de los antígenos en función de la variable tumor posterior.** G.A=Grupo A, G.B=Grupo B, Le a=Lewis a, Le b=Lewis b, Le x=Lewis x, Le y= Lewis y, No= No tumor posterior, Si= Si tumor posterior. Se expresan los casos en forma de %. N Grupo A: NO=60, SI=43; N Grupo B: NO=60, SI=43; N Lewis a: NO=60, SI=43; N Lewis b: NO=59, SI=43 ; N Lewis x: NO=59, SI=43; Lewis y: NO=57, SI=43; N hsp27: NO=58, SI=43; N hsp60: NO=59, SI=43; N hsp70: NO=59, SI=43; N hsp90: NO=59, SI=43.

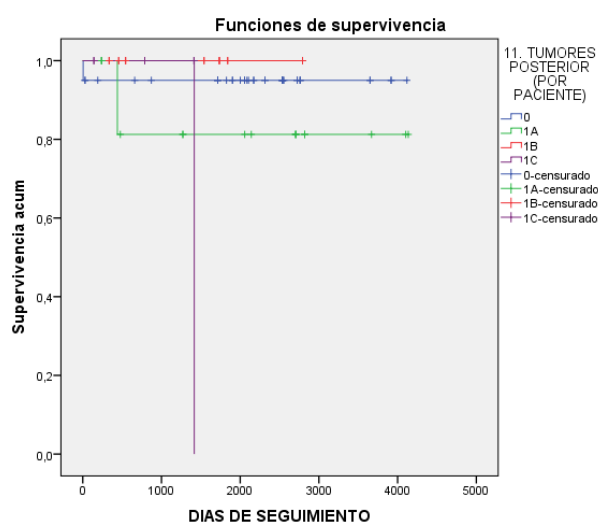
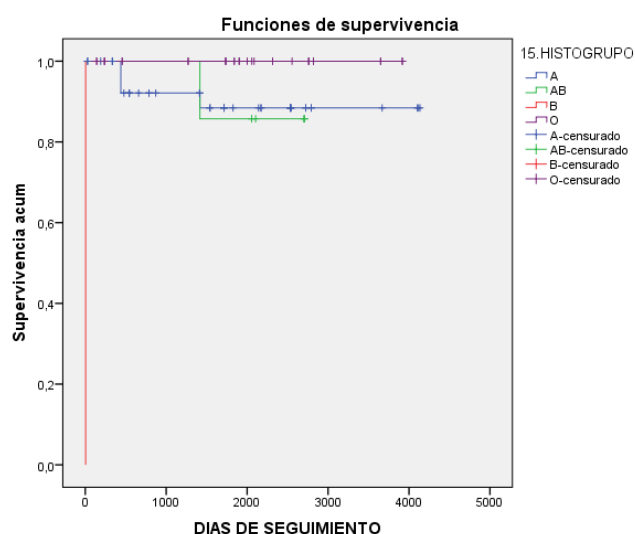
#### 4. Resultados del análisis de Supervivencia

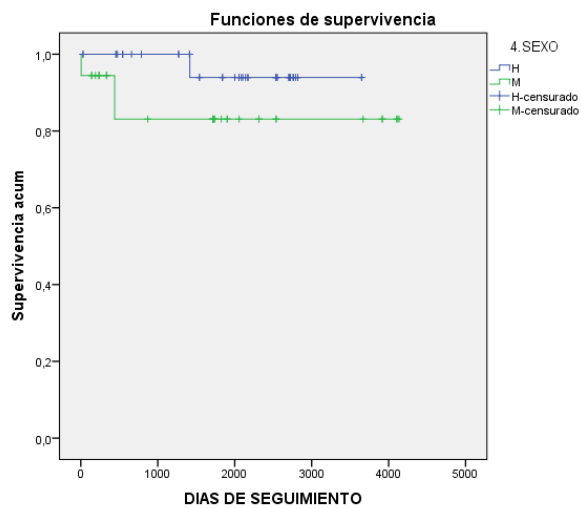
En la *Tabla 39* se muestra el estado de los pacientes.

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje Válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Vive	30	28,3	35,7	35,7
	Muere por cáncer	7	6,6	8,3	44
	Perdido	47	44,3	56	100
	Total	84	79,2	100	
Perdidos	Sistema	22	20,8		
Total		106	100		

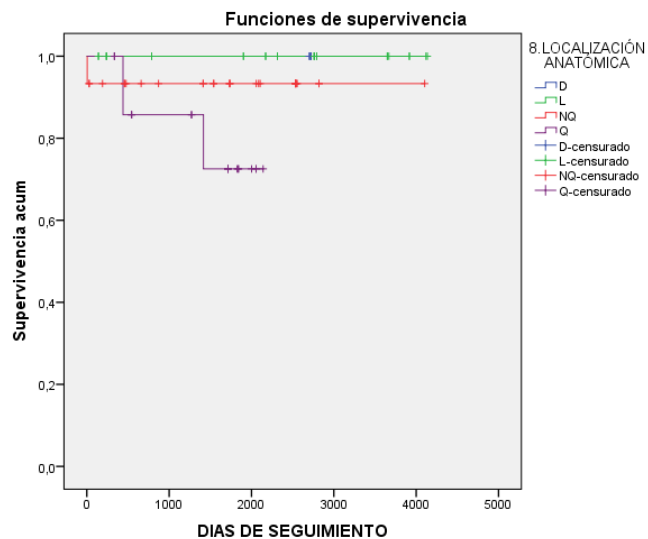
**Tabla 39. Estado de las lesiones pertenecientes a los 65 pacientes.** Existen 3 posibilidades :Viven, mueren por cáncer(oral y/ó no oral) ó se pierden los datos ,ó han muerto por una causa diferente al cáncer.

Al analizar mediante el método de *Kaplan Meier* la influencia de los diferentes parámetros en la supervivencia se observa que las variables que tuvieron alguna influencia en la supervivencia fueron las variables *grupo histo-sanguíneo* y *tumor posterior*. Las variables que mostraron una cierta tendencia a la influencia en la supervivencia fueron las variables *sexo*, *localización anatómica* y *expresión dicotómica de los antígenos Grupo A y B*. Con el resto de las variables no se apreció ninguna influencia en la supervivencia. Al lado de cada figura se explica más detalladamente el papel de estas variables en la supervivencia.



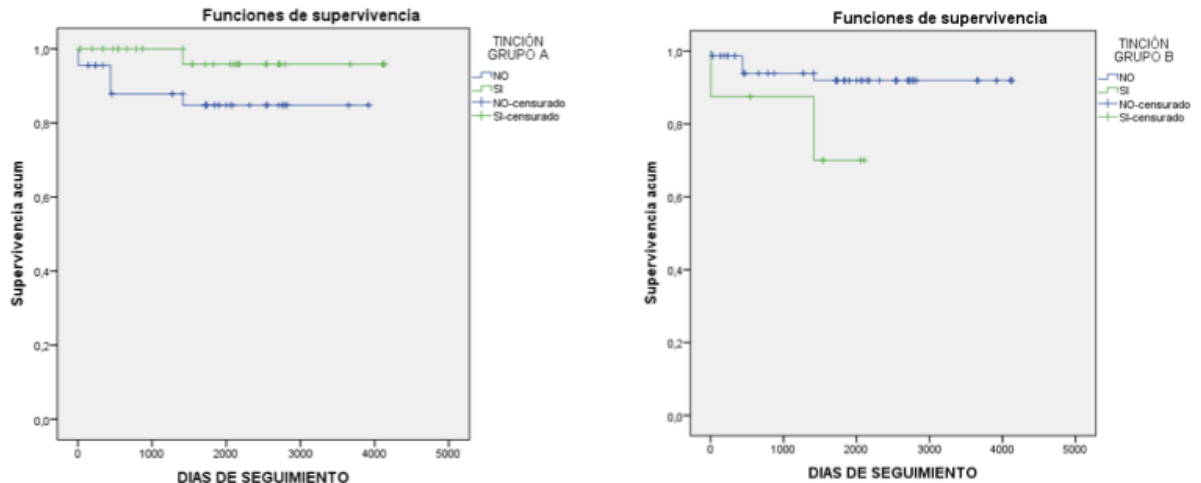


**Fig.15. Influencia de la variable sexo en la supervivencia.** No existen DES ( $p=0.069$ ), si bien hay una mayor tendencia a la supervivencia en hombres.



**Fig.16. Influencia de la variable localización anatómica en la supervivencia.** Existe una tendencia a una menor supervivencia de las lesiones que se desarrollan en la encía queratinizada ( $p=0,052$ ).



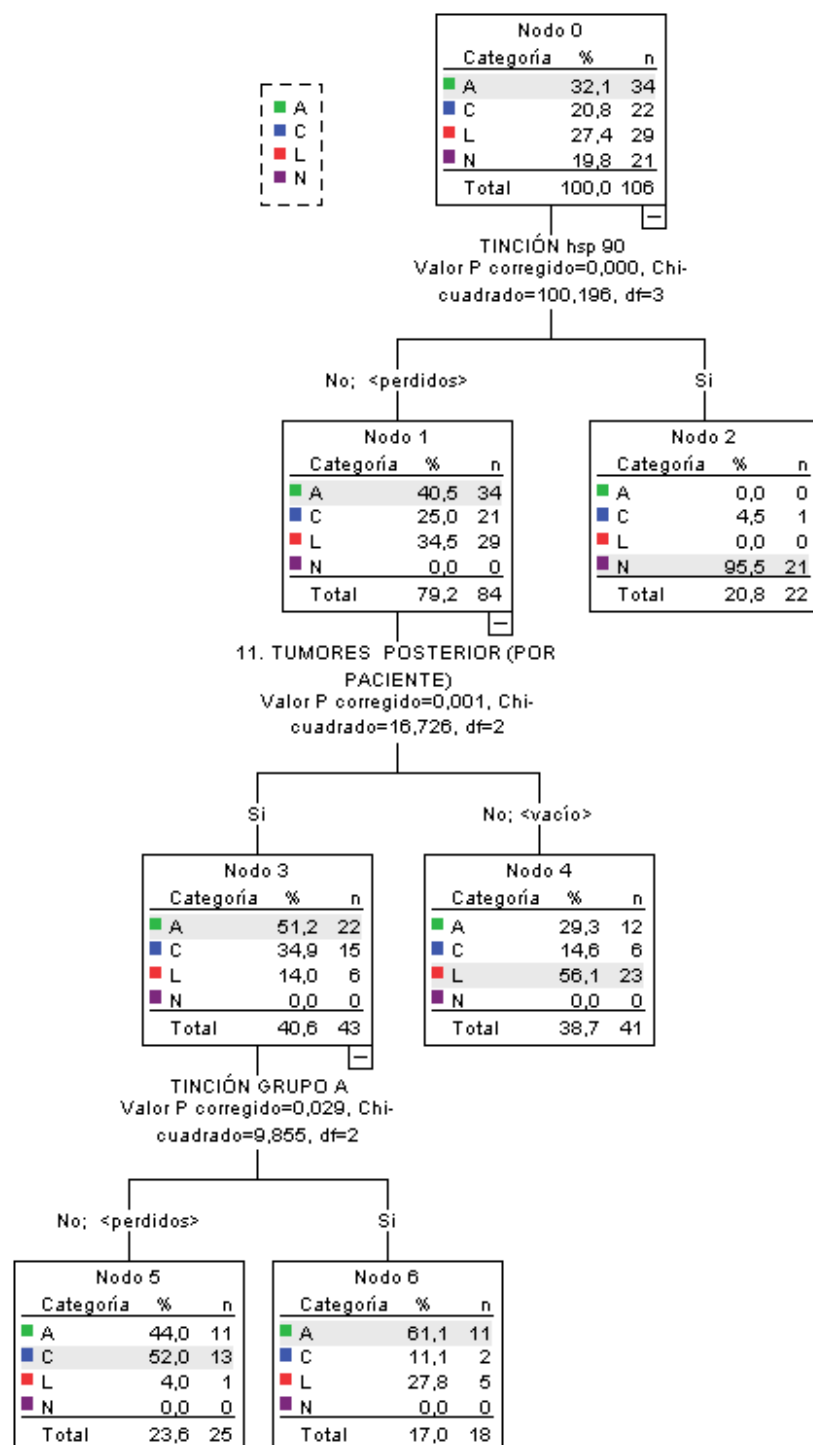


**Fig.17. Influencia de la expresión dicotómica de los antígenos de Grupo histo-sanguíneo A y B.** En relación con la expresión del antígeno de Grupo A existe una tendencia a una menor supervivencia en los casos donde no se expresa ( $p= 0.092$ ), mientras que en relación con la expresión del antígeno de grupo B, existe una tendencia a una menor supervivencia en los casos donde se expresa el grupo B ( $p= 0.092$ ).

## 5. Árbol de decisiones

Para tratar de detectar de entre un grupo de variables cuáles eran las más efectivas a la hora de discernir los grupos de lesiones principales, se llevó a cabo un árbol de decisiones tomando como variable independiente la variable *lesión histológica 1* y como variables dependientes las variables *sexo*, *localización anatómica*, *tumor posterior* y *expresión dicotómica de todos los antígenos sanguíneos y Proteínas de Choque Térmico estudiados*. Los resultados muestran que de las 13 variables la que mejor discrimina es la expresión dicotómica de *hsp90*, de tal forma que si el espécimen muestra tinción existe una altísima probabilidad de que sea un espécimen perteneciente al grupo control. En los casos de expresión de *hsp90* negativa, la variable *tumor posterior* adquirió una influencia estadísticamente significativa, de tal forma que en los casos donde hubo un tumor posterior la mayor probabilidad era de que se trataran de Áreas adyacentes a carcinomas, en definitiva tejido sometido a los eventos carcinogénicos, adquiriendo una influencia estadísticamente significativa en estos casos, también la *expresión dicotómica del grupo A*, ya que en los casos que no expresaran grupo A existiría una alta probabilidad de que fueran COCEs. Ver *Figura 18*.

## 2.1.LESIÓN HISTOLÓGICA 1



**Fig. 18. Árbol de decisiones.** La hsp90 discriminó muy bien entre el grupo control y los otros grupos de lesiones. En los casos negativos para la expresión de hsp90 hubo influencia de las variables tumor posterior y expresión del grupo A.

#### IV. DISCUSIÓN

El cáncer oral podría definirse como una amenaza imprevisible desde el punto de vista de su aparición silenciosa e inesperada. El hecho del aumento de su incidencia en las últimas décadas, así como la no existencia de una mejora en las tasas de supervivencia durante los últimos 50 años, hace necesarios los esfuerzos en la actividad investigadora por ahondar en su etiología y patogénesis y, más importante, aún si cabe, en su prevención y diagnóstico precoz.

En este estudio se han analizado Carcinomas Orales de Células Escamosas, ya que este tipo de cáncer oral supone el 95% de todos los cánceres orales, y leucoplasias orales, que dentro de las lesiones orales potencialmente malignas, constituyen el grupo con mayor prevalencia en nuestro medio.

Tal y como se ha descrito en la parte de la introducción de este trabajo, el uso de la clasificación de displasia epitelial como marcador del riesgo de transformación maligna presenta sus limitaciones, lo que hace inminente la necesidad de la aparición de parámetros que objetivamente establezcan el mayor ó menor riesgo de transformación maligna de una determinada lesión. En este sentido determinados marcadores moleculares, como los antígenos de grupo histo-sanguíneo y las proteínas de choque térmico, analizando su expresión mediante técnicas rutinarias de inmunohistoquímica, y actuando individual ó conjuntamente, podrían alzarse como señales de alarma de una inminente transformación maligna.

Al hacer una valoración global de la **muestra** analizada en este estudio, se observa que en relación con la *edad* de aparición de las lesiones, los resultados coinciden con lo mostrado en los estudios epidemiológicos<sup>(1, 29)</sup>. Se observa en la muestra una mayor prevalencia de COCEs y Leucoplasias en hombres que en mujeres. La tendencia mundial es que la incidencia del COCE está aumentando más rápidamente en mujeres que en hombres. La proporción de hombre a mujer diagnosticado con cáncer oral está alrededor de 1,5:1. Una explicación a este fenómeno es que el consumo del tabaco y el alcohol entre las mujeres se considera actualmente más aceptable desde el punto de vista social que antiguamente<sup>(3, 5)</sup>. Algunos datos epidemiológicos correlacionan la asociación de determinadas enfermedades sistémicas y el riesgo de desarrollar cáncer oral y lesiones orales potencialmente malignas. Se ha descrito que en estas enfermedades el vínculo de unión con el cáncer oral podría ser a partir de la

exposición ante los mismos factores de riesgo, destacando, entre estos, el tabaco<sup>(123, 125, 126)</sup>. En este sentido, el hábito tabáquico estuvo presente en la mayoría de los casos de COCEs corroborando lo descrito en la literatura científica, sin embargo, no estuvo notoriamente presente en el grupo de las leucoplasias, no siendo esto un hallazgo frecuentemente descrito por otros autores, si bien se reconoce la existencia de leucoplasias idiopáticas<sup>(28)</sup>. El alcohol estuvo presente en prácticamente la mitad de los casos de COCE confirmando la influencia de este factor de riesgo<sup>(1)</sup>. Una de las localizaciones más frecuentes del COCE es la lengua<sup>(1)</sup>. En nuestra muestra la zona de la lengua más afectada fue el borde lateral y tan sólo un caso se originó en el dorso lingual, coincidiendo con lo observado por Rautava y cols en 2006<sup>(5)</sup>. En las leucoplasias se ha descrito como principal zona de malignización el suelo de la boca<sup>(127)</sup>. Varias lesiones de la muestra se presentaron en pacientes que habían tenido algún tumor previo ó que desarrollaron posteriormente otros tumores. Se sabe que del 10 al 35% de los pacientes con cáncer oral tienen riesgo de desarrollar tumores secundarios que pueden ser *sincrónicos*, cuando aparecen a la par que el tumor primario, ó *metacrónicos*, cuando aparecen tras un intervalo mayor de 6 meses. Lo más frecuente es encontrar estos tumores secundarios adyacentes al tumor primario principal una vez tratado<sup>(1)</sup>. Por otro lado, la mayoría de las lesiones de la muestra pertenecieron a pacientes del grupo A u O coincidiendo con los datos epidemiológicos mundiales<sup>(67)</sup>.

Respecto al **método de recuento** utilizado, la realización de una validación del mismo, da fuerza a los resultados obtenidos. Se han descrito diferentes métodos para valorar la expresión de los antígenos a nivel oral, entre los que se incluye el conteo de células en campos elegidos al azar<sup>(16, 101, 128-133)</sup>. Nuestra intención fue analizar el total de las lesiones que se mostraban en cada corte, tratando de obtener la máxima información posible.

Los **antígenos ABO y Lewis** son las estructuras terminales de las cadenas de glicanos<sup>(134)</sup>. Fueron descubiertos inicialmente en las células rojas, pero curiosamente los estudios filogenéticos muestran que los eritrocitos han sido los últimos en adquirirlos<sup>(70)</sup>. Al detectarse posteriormente una distribución tisular de estos antígenos sanguíneos en otras células, principalmente epiteliales, y también en el endotelio vascular, en neuronas sensitivas<sup>(70)</sup> e incluso en oocitos<sup>(135)</sup> se les denominó antígenos de grupo histo-sanguíneo. Las estructuras precursoras de los antígenos sanguíneos

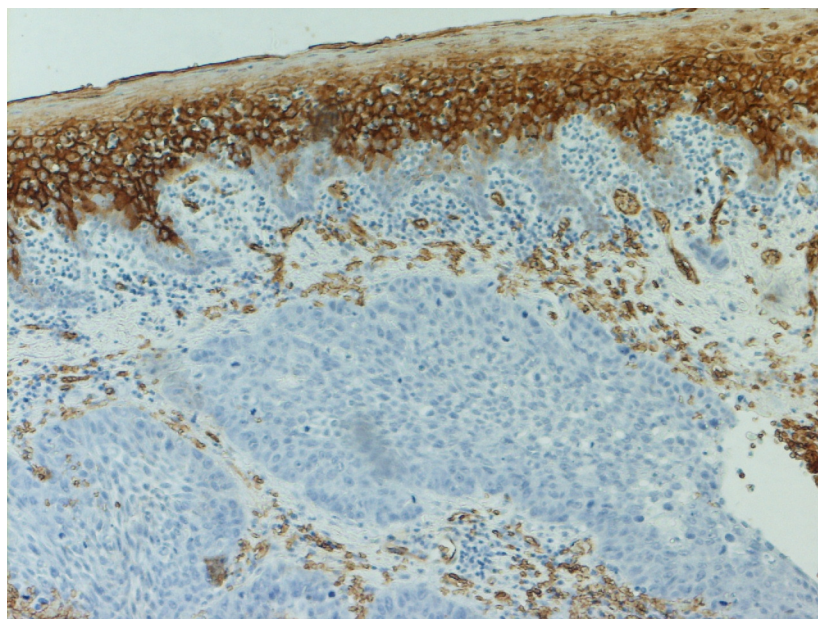
también se sintetizan y expresan en neutrófilos, linfocitos y monocitos, pero no se han detectado en músculo ó en el tejido conectivo<sup>(124, 134)</sup>. Varios autores describen la existencia de alteraciones en la expresión de los antígenos ABO y Lewis en diversos cánceres humanos<sup>(134)</sup>.

En relación a la expresión en el *estrato basal* de los antígenos de grupo histo-sanguíneo ABO y Lewis, en general podemos hablar de una escasa ó más bien, prácticamente nula tinción para todos los antígenos a excepción del antígeno *Lewis y*. Varios autores han descrito la escasa expresión de los antígenos de grupo sanguíneo ABO y Lewis en el estrato basal y parabasal <sup>(136)</sup>. Sin embargo, en el *estrato suprabasal* se han detectado hallazgos interesantes.

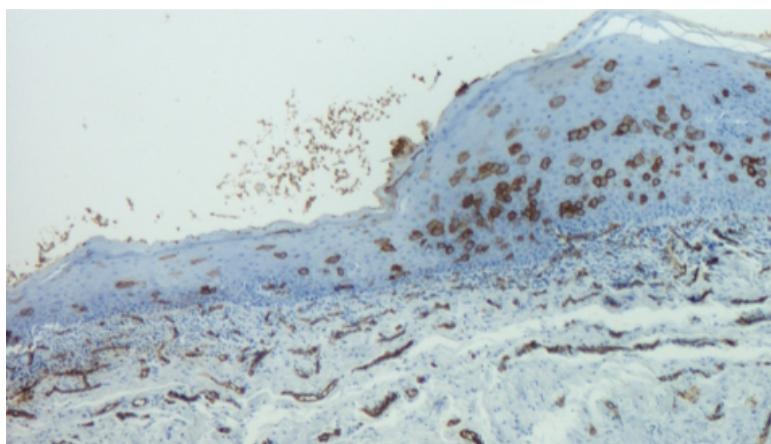
En relación a la expresión de los antígenos de grupo sanguíneo ABO y Lewis, los acontecimientos más relevantes observados son los siguientes:

#### **1. Pérdida de expresión de los antígenos de grupo histo-sanguíneo A y B.**

El hecho más importante parecería ser la pérdida de expresión del antígeno de grupo histo-sanguíneo A en el grupo de los COCEs, mientras que en las Áreas adyacentes a los COCEs sin displasia y en las Leucoplasias sin displasia también se observó una pérdida de expresión del antígeno A, mostrando del 40 al 47% de las células expresión del antígeno A, pero la expresión de este antígeno fue significativamente superior a la de los COCEs, pudiendo indicar esto una pérdida mayor de expresión del antígeno de grupo A a medida que se avanza el camino hacia la malignización. *Ver Fotos 1 y 2.*



**Foto 1. Inmunohistoquímica de grupo histo-sanguíneo A en un COCE en un paciente de grupo sanguíneo A.** Se observa la pérdida de expresión del antígeno en el COCE( centro de la imagen) y la expresión positiva en un área adyacente al mismo (parte superior de la imagen).



**Foto 2. Inmunohistoquímica de grupo histo-sanguíneo A en una leucoplasia en un paciente de grupo sanguíneo A.** Se observa pérdida de expresión del antígeno de grupo A. Véase una menor expresión del antígeno en la zona de leucoplasia con displasia leve (izquierda) que en la zona sin displasia (derecha).

En el caso del antígeno de grupo B, hubo una escasa expresión en todos los grupos sin diferencias entre los mismos. Hay que tener en cuenta que en cualquier tejido la expresión de los antígenos de grupo histo-sanguíneo varía en relación con el grupo sanguíneo individual (ABO, Lewis, estatus de secretor), el tipo de epitelio y la diferenciación celular dentro del epitelio<sup>(124)</sup>. De este modo, la escasa expresión del antígeno de Grupo B podría justificarse por el hecho de que tan sólo un 11,3% de los individuos fueron del grupo AB y un 1,9% del grupo B. Por otro lado también se ha descrito la pérdida del antígeno de grupo B en COCEs<sup>(137)</sup>. En pacientes de grupo sanguíneo AB se ha detectado una expresión positiva del antígeno de grupo A en mucosa normal y una expresión negativa en displasia y COCE, mientras que la expresión del antígeno de grupo B fue débilmente positiva en mucosa normal y positiva en displasia y COCE. Se ha postulado que en la mucosa normal podría darse una competición entre las enzimas A y B y que en las áreas con displasia y COCE podría existir una pérdida del alelo A y una retención del alelo B<sup>(138)</sup>.

El primer escrito que habló de cambios en los antígenos de grupo sanguíneo ABO en tumores proviene de 1930, descrito por Thomsen y cols., y concretamente, los primeros cambios orales fueron detectados por Kovarik en 1968, y confirmados posteriormente por varios autores. Hay una fuerte evidencia que sugiere que las alteraciones de los carbohidratos en la superficie celular dota a las células de moléculas de reconocimiento diferentes, bien mediante la provisión a la célula de un receptor que interacciona con otras células, o bien, mediante la modificación de receptores proteicos<sup>(139)</sup>. En general, las alteraciones en los carbohidratos de la superficie celular, conocidas como alteraciones en la glicosilación, se han clasificado en :

- a) Síntesis incompleta, con ó sin acumulación de precursores
- b) Síntesis de neo-glicolípidos
- c) Cambios de organización en los glicolípidos de las membranas celulares<sup>(73)</sup>.

Si bien, el debate está en si la existencia de una glicosilación aberrante es el resultado ó la causa del cáncer<sup>(140)</sup>.

Dabelsteen y Pindborj detectan, en 1973, mediante inmunofluorescencia la pérdida total del antígeno de grupo A en 6/12 de los COCEs analizados. En el resto, un caso no perdió la positividad y los demás mostraron una pérdida parcheada. Además observan una mayor disminución en la expresión del antígeno a medida que se

progresaba de mucosa adyacente sin displasia a mucosa adyacente con displasia y de ésta a carcinoma. Un hallazgo importante fue que, mediante titulaciones detectaron que las áreas positivas en los carcinomas presentaban menores títulos de anticuerpos que la mucosa inmediatamente adyacente<sup>(141)</sup>. Mandel y cols., en 1992, detectan una pérdida de expresión del antígeno A en el 45% de los COCEs analizados y en el resto de los COCEs detectan áreas aisladas positivas, sobretudo en zonas queratinizadas, ó gran tinción en más de la mitad de las células tumorales. En las áreas adyacentes sin displasia se observa expresión del antígeno A en estrato espinoso y no en el estrato basal mientras que en las áreas adyacentes con displasia de alto grado se observa pérdida total ó parcial de expresión del antígeno A<sup>(142)</sup>. En el análisis de 30 COCEs junto con la mucosa adyacente sin displasia y dos controles, llevado a cabo por *Gao y cols. en el 2004*<sup>(137)</sup>, se detecta pérdida de expresión de los antígenos de grupo sanguíneo A y B en el 84% de los tumores, siendo la pérdida en la mayoría de los casos total y en el resto parcial.

En el posible análisis de la causa de esta pérdida de expresión observaron como la expresión de las transferasas A/B se correlacionó con la expresión de los antígenos, por lo que la expresión estaría controlada a nivel enzimático. Esto también se ha observado en carcinomas de vejiga<sup>(142)</sup>. En el análisis epigenético, *Gao y cols.*, observaron que sólo algunos casos de pérdida de expresión de los antígenos A y B en COCEs, se pudieron explicar por una pérdida alélica, pérdida de heterocigosidad, inestabilidad de microsatélite ó hipermetilación en el gen ABO<sup>(137)</sup>, por lo que otros factores posibles podrían estar actuando, tales como la alteración en la actividad de transporte de los nucleótidos de los carbohidratos en el aparato de Golgi tal y como se ha visto en cólon<sup>(143)</sup>, la presencia de otras enzimas como glicosidasas y glicosilhidrolasas que degraden carbohidratos celulares tal y como se ha observado en epidermis<sup>(74)</sup> y la competición entre múltiples glicosiltransferasas por el sustrato donante, el mismo aceptor ó por ambos<sup>(72, 144)</sup>. En colon se ha descrito que existen dos principales factores que influyen la expresión de los antígenos sanguíneos, siendo el primero de ellos las alteraciones en el núcleo ó en la organización de la cadena portadora de los carbohidratos que derivan en alteraciones en el desarrollo y la transformación y el segundo factor serían las modificaciones en la fucosilación y sialilación<sup>(145)</sup>.

En el caso del colon los antígenos sanguíneos se expresan en la parte proximal del mismo, pero durante la carcinogénesis se re-expresan en los tumores colónicos



distales. En un estudio se detectó como esta re-expresión en el caso del antígeno de grupo A se correspondía con el antígeno A detectado en feto, pero no con el antígeno expresado en la parte proximal normal<sup>(145)</sup>. Asimismo se ha observado como la re-expresión de los antígenos de grupo A y B en los tumores en la parte distal del colon no se correlacionaron con la expresión de las transferasas A y B<sup>(142)</sup>. En pulmón también se ha detectado una pérdida de expresión de los antígenos A y B en carcinomas<sup>(146-148)</sup> así como en lesiones de metaplasia bronquial, lo cual se correlacionó con la incidencia de lesiones de alto grado de displasia así como con un aumento en la actividad hiperproliferativa, todo ello relacionado con un aumento en el riesgo de cáncer de pulmón<sup>(149)</sup>. La pérdida de expresión de los antígenos A y B también se ha detectado en otros cánceres de estómago<sup>(150)</sup>, páncreas<sup>(151, 152)</sup>, próstata<sup>(153)</sup>, mama<sup>(154)</sup>, endometrio<sup>(155, 156)</sup> y ovario<sup>(157, 158)</sup>.

El grupo de Dabelsteen y cols., en 1975, mediante inmunofluorescencia, analizan la expresión de los antígenos de grupo A y B en un grupo de lesiones con un grado variable de displasia (18 leucoplasias, 1 eritroplasia, 3 liquen plano), en 18 leucoplasias sin displasia y en 38 lesiones queratósicas orales benignas. Los resultados muestran la pérdida de expresión de los antígenos en todas las lesiones displásicas y en 4 casos de leucoplasias sin displasia. Por otro lado, no se detectó pérdida de expresión de los antígenos en las lesiones queratósicas benignas<sup>(159)</sup>. El mismo grupo, en 1983, detecta una disminución de la expresión del antígeno A en lesiones premalignas junto con una acumulación del precursor H. Analizaron 10 lesiones orales premalignas (carcinomas in situ y displasia epitelial severa), 10 COCEs y 12 especímenes de mucosa normal de feto de 10 a 20 semanas desde la fertilización, en pacientes de grupo sanguíneo A y O. En carcinomas, a parte de la pérdida de expresión del antígeno A, la distribución del precursor H fue irregular, mientras que en las lesiones premalignas hubo pérdida de expresión del antígeno A junto con un aumento en la acumulación del precursor-H a lo largo de todos los estratos epiteliales, en vez de en los estratos más profundos tal y como ocurrió en la mucosa normal. Los autores comentan que esta acumulación del precursor pudo influir en la falta de expresión del antígeno A y pudo deberse a la falta de la actividad de enzimas que transformaran el precursor H en antígeno A, pero al ocurrir también en individuos de grupo O parecería que la causa de la acumulación no es solamente por el bloqueo de la síntesis del antígeno A<sup>(74)</sup>. En otro estudio llevado a cabo por Gao y cols. en 2004, se analiza la expresión de los antígenos

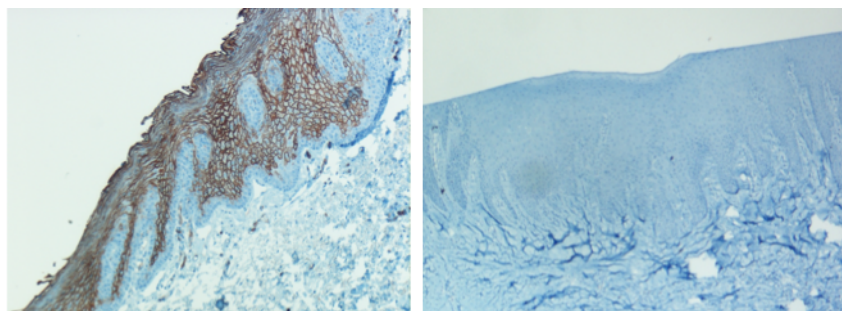
sanguíneos A y B en Leucoplasias con distinto grado de displasia epitelial (28 Sin displasia, 31 con displasia de bajo grado y 10 con displasia de alto grado) y en 39 COCEs junto con la mucosa sin displasia adyacente a los carcinomas. Confirmando su estudio anterior, se detecta nuevamente pérdida total ó parcheada en la mayoría de los COCEs. Asimismo se detecta esta pérdida en las leucoplasias con algún grado de displasia, existiendo diferencias estadísticamente significativas al comparar los grupos de COCE y Leucoplasias con algún grado de displasia con las leucoplasias sin displasia. A nivel epigenético, nuevamente no todos los casos con pérdida de expresión se correlacionaron con una pérdida alélica, sin embargo detectaron una pérdida alélica estadísticamente significativamente superior en el grupo de los COCEs al compararlo con el grupo de las Leucoplasias<sup>(138)</sup>.

Con estos hallazgos, nuestros resultados parecen coincidir con los descritos por el resto de los autores. Un hecho importante comentado por Orlow y cols. en 1998, es el dato de que si el 50% de la población es del grupo O, qué influencia podría tener la pérdida de los alelos A/B. Los autores comentan que probablemente también se vean afectados genes supresores tumorales situados cercanos a la región de los genes ABO<sup>(160)</sup>. Otro hecho importante observado en estudios de cicatrización en la mucosa oral es la pérdida de expresión del antígeno A<sup>(161)</sup>. Se ha observado una expresión normal de los antígenos A/B en los márgenes hiper-proliferativos y ausencia de expresión en las células migratorias no proliferativas de la herida original. Se sabe que las células del estrato basal, con capacidad para migrar a estratos superiores, no expresan estos antígenos. Asimismo, las células cancerosas que pueden migrar tampoco expresan estos antígenos<sup>(136)</sup>, por lo que la falta de expresión de los antígenos ABO podría estar relacionado con la capacidad de migración ó hipotéticamente con la capacidad invasiva más que con la de proliferación<sup>(162)</sup>, pudiendo esto tener una gran importancia en el proceso de la carcinogénesis. También se ha visto en modelos experimentales de cáncer de colon en rata como la presencia de los antígenos H ó A permite a las células tumorales escapar al control inmunológico mediante el aumento de su resistencia a la apoptosis<sup>(163)</sup>.

## **2. En el grupo control también hubo una escasa expresión de los antígenos de grupo A y B.**

El sistema de antígenos ABO fue analizado por primera vez en la mucosa oral normal por Yosida en 1928<sup>(139)</sup>. En función del tipo de epitelio oral se han descrito

diferencias en la expresión de los antígenos sanguíneos relacionadas con la función e histología tisular, de tal manera que, el epitelio escamoso queratinizado expresa los antígenos A ó B en muy pocas células altamente diferenciadas, detectándose el precursor H en la mayoría de las células espinosas. En cambio, en el epitelio no queratinizado de la mucosa bucal, el precursor H sólo se expresa en unas cuantas células parabasales, mientras que la expresión de A y B puede observarse en la mayoría de las células espinosas <sup>(68, 139)</sup>. El hecho de que la mayoría de los controles se obtuvieron de encía queratinizada podría justificar la escasa expresión de los antígenos A y B, así como el escaso grupo de pacientes pertenecientes al grupo AB ó B. *Ver Foto 3.*



**Foto 3. Inmunohistoquímica de grupo histo-sanguíneo A en un grupo control procedente de mucosa no queratinizada y en un grupo control procedente de encía queratinizada .** Ambos especímenes pertenecían a pacientes de grupo sanguíneo A. Véase la marcada expresión en la mucosa no queratinizada (izquierda) al compararla con la encía queratinizada.

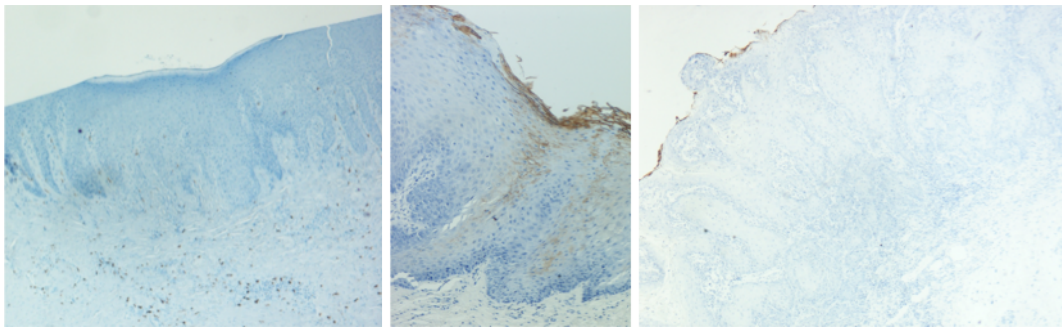
Siguiendo esta idea se postuló que la falta de expresión de los antígenos sanguíneos en COCE y Leucoplasia podría deberse al hecho de que como en muchos COCEs y lesiones potencialmente malignas existe la transición de un epitelio no queratinizado a uno queratinizado, la falta de expresión de los antígenos en estas lesiones sería debida a un cambio en el patrón de diferenciación del epitelio. Sin embargo se ha comprobado como varias leucoplasias (queratinizadas) expresaron el antígeno, por lo que este supuesto no se cumpliría <sup>(138)</sup>.

### **3. Escasa expresión en general de los antígenos Lewis a, Lewis b y Lewis x en comparación con una expresión muy marcada del antígeno Lewis y , en todos los grupos a analizar, incluyendo el grupo control.**

Los antígenos el grupo histo-sanguíneo Lewis son adsorbidos desde el plasma y el estatus de secretor influye en la expresión de tales antígenos de tal forma que los

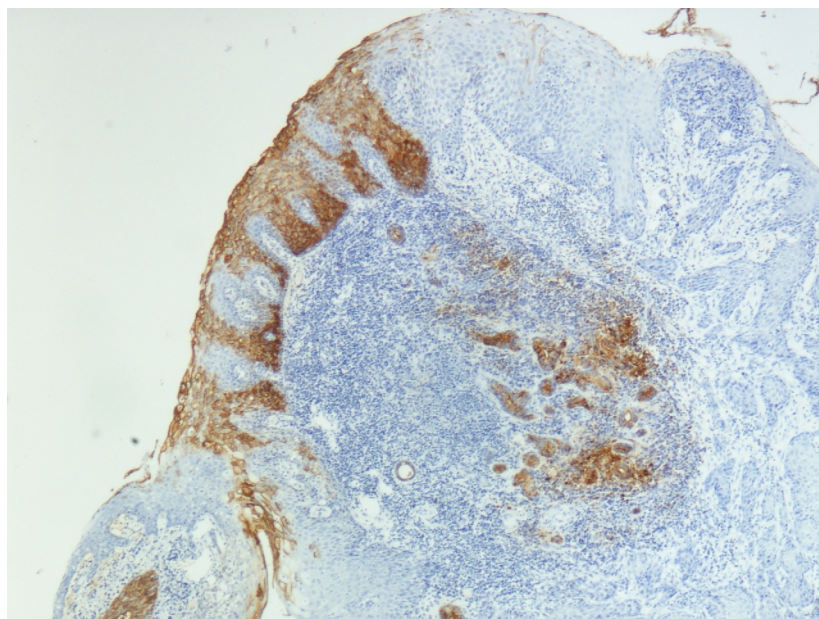
individuos secretores expresarán Le<sup>b</sup> y Le<sup>y</sup> y los no secretores no expresarán tales antígenos pero sí los antígenos Le<sup>a</sup> y Le<sup>x</sup>. Dado el hecho de que los especímenes a analizar en este estudio se obtuvieron de los archivos del hospital, no teníamos la posibilidad de conocer el estatus de secretor del paciente salvo en unos cuantos especímenes donde en el mismo corte de los COCEs aparecían también glándulas salivales. Sin embargo este no fue un hallazgo frecuente por lo que resulta difícil analizar la influencia de la expresión/no expresión de estos antígenos en este estudio.

En la Foto 4 se muestra la escasa expresión del antígeno de grupo histo-sanguíneo le<sup>a</sup> en mucosa control, leucoplasia y carcinoma. *Ver Foto 4.*

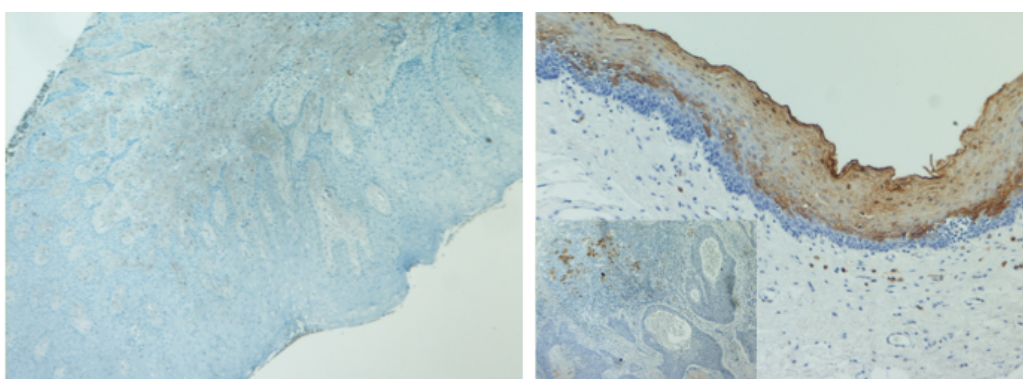


**Foto 4. Inmunohistoquímica de grupo histo-sanguíneo Lewis a en mucosa control, leucoplasia y COCE. Véase la escasa expresión del antígeno en los tres grupos de lesiones.**

En el caso concreto del antígeno le<sup>b</sup>, si bien la tinción fue escasa también, hubo diferencias significativas al comparar las áreas adyacentes al COCE con displasia de bajo grado, que mostraron mayor tinción, con la mucosa control, al igual que para el antígeno le<sup>x</sup>, donde también hubo diferencias al comparar el grupo de las áreas adyacentes y de las leucoplasias sin displasia con el grupo control. El hecho de un aumento de expresión en estas áreas podría indicar una señal de alarma temprana que posteriormente desaparecería en los COCEs. *Ver Fotos 5 y 6.*



**Foto 5. Inmunohistoquímica de grupo histo-sanguíneo Lewis b en un COCE.** Véase la escasa expresión en el carcinoma (centro de la imagen) y el aumento de expresión en el área adyacente al mismo (izquierda de la imagen).



**Foto 6. Inmunohistoquímica de grupo histo-sanguíneo Lewis x en mucosa control y COCE.** Véase la escasa expresión en la mucosa control (primera imagen) y en el carcinoma (foto reducida en esquina inferior) y un aumento de expresión en el área adyacente al mismo (parte superior de la segunda imagen).

Se ha observado como la expresión de los antígenos  $le^a$ ,  $le^b$  y  $le^x$  aumenta ó disminuye en diferentes cánceres en función del órgano afectado, adquiriendo implicaciones biológicas diferentes<sup>(134)</sup>.

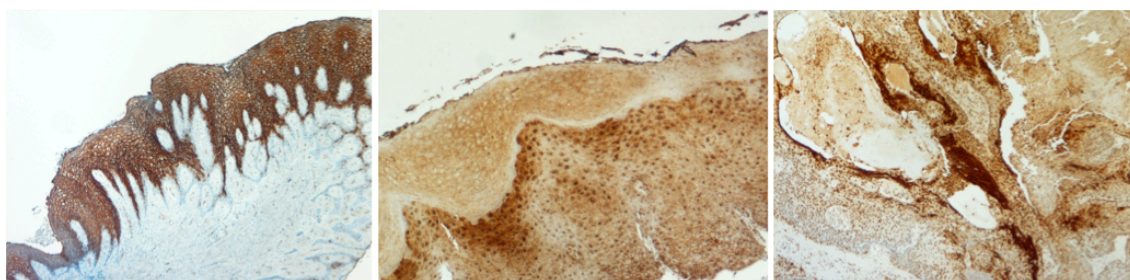
Respecto al significado real de las alteraciones en la glicosilación, podríamos hablar simplemente de estar reflejando cambios en la diferenciación de las células



cancerosas comparadas con las células normales, pero habiéndose detectado la influencia de estas alteraciones en la supervivencia se piensa en cómo los antígenos sanguíneos pueden modular las propiedades biológicas de las células cancerosas. En este sentido destacar las asociaciones descritas de los antígenos sialil-Le<sup>a</sup> y sialil-Le<sup>x</sup> que funcionan como ligandos de selectinas que están implicadas en la adhesión de leucocitos a plaquetas, al endotelio vascular ó al endotelio vascular especializado de los órganos linfoides. La presencia de los ligandos de selectinas en la superficie de las células cancerosas circulantes podría permitir su fijación en el endotelio vascular a través de la E-selectina facilitando así su posterior diseminación. La adhesión de plaquetas ó leucocitos a través de la selectina P ó L daría lugar a la formación de micro-émbolos facilitando su detención y el proceso de extravasación<sup>(134, 140)</sup>. Se ha descrito que una alta expresión de sialil-Le<sup>a</sup> en COCEs primarios de la cavidad oral se asoció con metástasis prediciendo de este modo un mal pronóstico<sup>(164)</sup>.

En el caso del antígeno Lewis y se observa en el *estrato basal* una mayor expresión en los grupos de COCE y Leucoplasia frente a las Áreas adyacentes a los carcinomas y al grupo control y dado que concretamente las zonas menos teñidas fueron las Áreas adyacentes sin displasia ó con displasia de bajo grado y la mucosa control, esto podría estar indicando un aumento en la expresión del antígeno Le<sup>y</sup> en el camino hacia la malignización.

Sin embargo, la expresión del antígeno Lewis y en el *estrato suprabasal* fue muy marcada en todos los grupos, sin distinción significativa entre ellos. *Ver Foto 7.*



**Foto 7. Inmunohistoquímica de grupo histo-sanguíneo Lewis y en mucosa control, leucoplasia y COCE. Véase la gran expresión de este antígeno en todos los grupos, especialmente en el COCE.**

Durante la diferenciación terminal, las células epiteliales orales adquieren la habilidad para producir productos especializados como queratinas y carbohidratos de la superficie celular que portarán antígenos específicos de los sistemas de grupos sanguíneos. La expresión de los carbohidratos de la superficie celular podrá variar en

función del estadio de diferenciación, de los diferentes patrones de diferenciación tisular y de la genética individual (tipo de grupo sanguíneo de la persona y estatus de secretor)<sup>(136)</sup>. Se ha descrito que en el epitelio oral normal, el antígeno Le<sup>y</sup> se expresa en las células parabasales, mientras que en las lesiones con displasia epitelial la expresión de Le<sup>y</sup> se detecta en las células del estrato espinoso, posiblemente reflejando una diferenciación epitelial alterada<sup>(136)</sup>. Al analizar la expresión de le<sup>x</sup> y le<sup>y</sup> en varias lesiones orales, Dabelsteen y cols. detectan una expresión en liquen plano oral atrófico similar a la hallada en mucosa normal. La expresión en leucoplasias homogéneas fue similar a la mucosa normal salvo que, en las primeras, la intensidad fue mayor. En las eritroplasias con displasia epitelial tanto le<sup>x</sup> como le<sup>y</sup> sólo se expresaron en las células más superficiales, coincidiendo con la acumulación del precursor H en el estrato espinoso y en ocasiones también en el estrato basal, mientras que en los COCEs se observó una tinción en 5 de 8 casos siendo la mayoría de las células negativas para el antígeno H<sup>(165)</sup>. Xie y cols. analizaron la expresión de Ley y el antígeno H en 80 COCEs de lengua detectando una gran expresión de ambos antígenos, en el 48% y el 77% de los tumores respectivamente. También pudieron comprobar como la expresión de ambos antígenos se correlacionó con marcadores de proliferación y no con marcadores apoptóticos<sup>(166)</sup>.

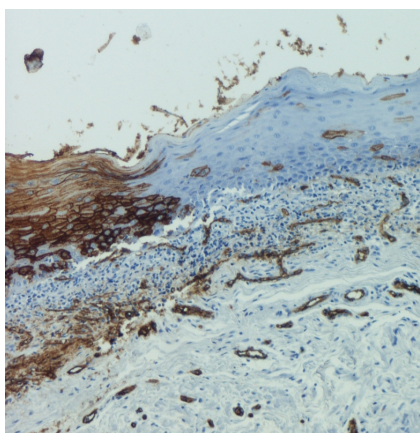
En general, se ha observado un aumento de expresión del antígeno Le<sup>y</sup> en prácticamente todos los tipos de carcinomas a excepción del carcinoma de páncreas y de endometrio donde, por el contrario, se ha observado una disminución en la expresión<sup>(134)</sup>. En el carcinoma de útero se observa en el camino hacia la malignidad una tendencia a la pérdida de expresión de los antígenos sanguíneos ABH y Lewis, con un patrón de tinción más heterogéneo en las lesiones más avanzadas junto con una sobreexpresión del antígeno le<sup>y(73)</sup>. En mucosa normal de colon se ha observado expresión de Le<sup>a</sup> y Le<sup>x</sup>, mientras que Le<sup>b</sup> y Le<sup>y</sup> se expresaron en menos del 50% de los especímenes. En el tejido carcinomatoso se detectó expresión de los cuatro antígenos y un aumento en la expresión de Le<sup>b</sup> y Le<sup>y</sup> respecto al tejido normal. El hecho de que en casos de individuos no secretores haya expresión de Le<sup>b</sup> y Le<sup>y</sup> en el tejido carcinomatoso podría indicar que el gen H en no secretores no está ausente, sino inactivado ó suprimido y la actividad cancerosa provoca la inducción de una determinada *fucosiltransferasa* que permita la expresión de los antígenos Le<sup>b</sup> y Le<sup>y(167)</sup>.

Es importante destacar la influencia de la sobreexpresión de Le<sup>y</sup> y su relación con la motilidad celular demostrada en los estudios de cicatrización en mucosa oral, lo curioso es que esta sobreexpresión no se correlacionó con el estatus de secretor<sup>(162)</sup>. También se ha detectado una posible actividad en la coagulación mediante la actuación del antígeno le<sup>y</sup> como cofactor de la actividad pro-coagulante en células tumorales<sup>(168)</sup> y su actividad angiogénica<sup>(169)</sup>. Asimismo destacar la detección de interacciones homofílicas como Le<sup>x</sup>-Le<sup>x</sup> ó H-Le<sup>y</sup> que podrían facilitar la agregación de las células tumorales ó su adhesión al endotelio vascular<sup>(170)</sup>. En estudios experimentales en ovario se ha observado una asociación entre el antígeno le<sup>y</sup> y determinadas integrinas<sup>(171)</sup>, así como el potencial de le<sup>y</sup> para fortalecer la adhesión mediante CD-44 permitiendo la diseminación de las células tumorales ováricas<sup>(172)</sup>.

**4. Los patrones de tinción horizontal se correlacionaron positivamente con la intensidad de la tinción que a su vez, al menos hipotéticamente, se puede asociar con la cantidad de antígeno presente.**

Cuando se detectaron los patrones Focal y Parcheado ó Focal y Completo, la tinción tuvo un rango amplio de intensidad desde débil a intensa y si la tinción siguió el patrón Difuso Completo la intensidad mostró un grado moderado/alto. Destacar que los escasos COCEs que expresaron tinción del antígeno de grupo A mostraron principalmente tinción Difusa Completa en la mayoría de los casos. La pérdida de expresión parcheada de los antígenos sanguíneos ha sido descrita también por varios autores como la existencia de áreas positivas alternando con áreas negativas<sup>(137)</sup>. La alternancia de zonas netamente positivas en inmediato contacto con zonas netamente negativas con un límite entre ambas zonas abrupto es un hecho absolutamente indudable y constante, demostrable tanto en mucosa oral como en otros territorios, que plantea hipótesis a ser consideradas en la génesis de las lesiones preneoplásicas y del tumor. Una hipótesis primaria podría ser que las actuaciones carcinogénicas se manifestaran de forma secuencial progresiva desde el punto de vista inmunohistoquímico con la desaparición del antígeno de grupo histo-sanguíneo antes de que se hicieran manifestas desde el punto de vista de la microscopía óptica. *Ver Foto 8.*





**Foto 8. Inmunohistoquímica de grupo histo-sanguíneo A en una lesión clasificada clínicamente como una leucoplasia. Véase la pérdida de expresión abrupta en sentido vertical.**

**5. Respecto a la localización intracelular de la tinción, todos los antígenos de grupo sanguíneo ABO y Lewis, a excepción del antígeno Le<sup>y</sup>, mostraron tinción fundamentalmente membranosa.** En algunos casos, para todos los antígenos, la tinción fue membranosa y citoplasmática y curiosamente esta tinción se dio en los COCEs a excepción de con el antígeno le<sup>b</sup>, que se dio en la mucosa control.

Mandel, y cols, en 1992, detectaron una expresión de los antígenos sanguíneos fundamentalmente membranosa, si bien en carcinomas escamosos describen una tinción membranosa y en algunos casos membranosa y citoplasmática, coincidiendo con nuestros resultados<sup>(142)</sup>. De igual forma, Dabelsteen y cols. detectan una expresión de le<sup>y</sup> fundamentalmente citoplasmática en carcinomas orales indicando que el traslado del antígeno le<sup>y</sup> desde la membrana hasta el citoplasma podría tener una relevancia fundamental en las interacciones de la célula con el medioambiente<sup>(165)</sup>. En COCEs de lengua el antígeno le<sup>y</sup> se ha localizado en la membrana de las células tumorales altamente diferenciadas y en el citoplasma de las áreas muy y pobremente diferenciadas<sup>(166)</sup>.

**6. En el análisis de supervivencia, pertenecer al grupo sanguíneo B, afecto negativamente.** Si bien, hay que tener en cuenta que sólo había dos pacientes del grupo B, los cuales murieron por cáncer. Asimismo, y corroborando lo anteriormente expuesto, en este análisis también se demostró una tendencia a una menor supervivencia en los casos donde se expresó el antígeno de grupo B. Por otro lado, también se demostró una

tendencia a una menor supervivencia en los casos donde no se expresó el antígeno de grupo A, complementando el hallazgo desarrollado en el punto 1. La reducción ó pérdida completa de la expresión de los antígenos A/B se ha correlacionado con un mal pronóstico en cánceres orales<sup>(173)</sup>, de vejiga<sup>(174)</sup> y de pulmón, en este último órgano especialmente con la pérdida del antígeno B<sup>(175)</sup>, mientras que se ha asociado con buen pronóstico con carcinomas colono-rectales. La sobreexpresión de Le<sup>b</sup>, y Le<sup>y</sup> se correlaciona con mal pronóstico en carcinomas de esófago, parte distal del colon, pulmón, mama y lengua. La sobreexpresión de Le<sup>x</sup> se ha asociado con riesgo de recidiva en el carcinoma de laringe (*Revisado por Le Pendu y cols.*)<sup>(134)</sup>.

## **7. Al buscar las posibles asociaciones entre la expresión dicotómica de los antígenos sanguíneos y otras variables encontramos lo siguiente:**

- Para el **antígeno de grupo A**, se aprecian diferencias significativas al comparar hombres y mujeres y dado el hecho de que la expresión de este antígeno parecería ser protectora, los hombres podrían tener alguna ventaja genética. Respecto al tabaco, la mayor expresión del antígeno se observó en lesiones que pertenecían a pacientes ex-fumadores existiendo diferencias significativas al compararlos con los no fumadores y fumadores, si bien los fumadores expresaron asimismo una mayor tinción estadísticamente significativa que los no fumadores. El mecanismo que pudiera estar implicado en este fenómeno permanece a día de hoy desconocido.

- Para el antígeno **Lewis a** se detectó una asociación entre la expresión dicotómica del antígeno y el consumo de alcohol, de tal forma que un porcentaje significativamente mayor de consumidores habituales de alcohol expresan este antígeno frente a los no consumidores. Nuevamente , el mecanismo implicado en este fenómeno permanece a día de hoy desconocido.

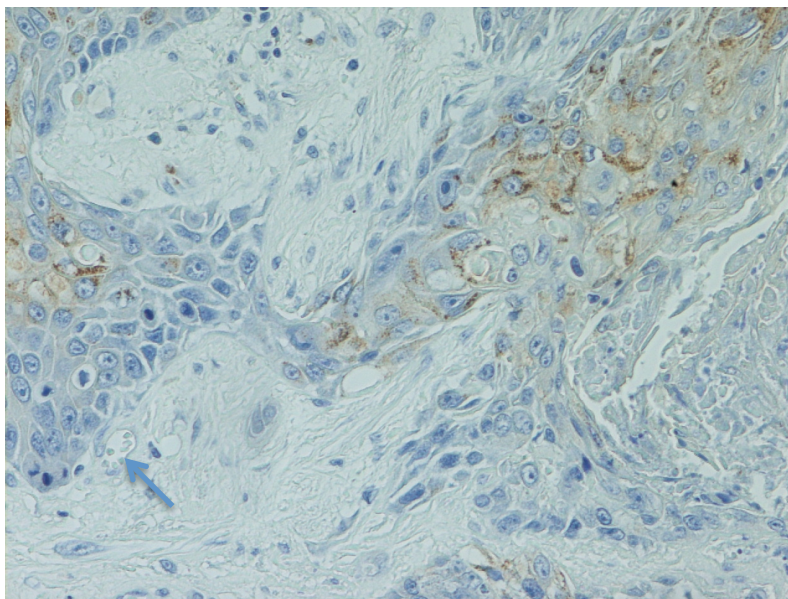
- Para el antígeno **Lewis y** se observó una asociación con la variable localización anatómica, detectando que en el dorso de la lengua se expresa menos le<sup>y</sup> que en las otras localizaciones, si bien, la expresión en general en todas las localizaciones fue alta.

Con el resto de las variables no pudo establecerse una correlación significativa, si bien somos conscientes de la disminución del tamaño muestral al hacer las subclasificaciones para todas las variables. Gao y cols. tampoco detectaron una correlación significativa entre la gradación maligna y la pérdida de expresión

antigénica<sup>(138)</sup>. Se ha podido observar en el colon que respecto al grado de diferenciación, los antígenos  $Le^x$  y  $Le^y$  no diferenciaban entre los carcinomas bien, moderado y pobremente diferenciados, pero hubo una disminución de  $Le^a$  y  $Le^b$  en los carcinomas pobremente diferenciados, lo que haría pensar en  $Le^a$  como marcador de células colónicas normales<sup>(167)</sup>.

#### **8. Expresión de un antígeno incompatible en un paciente de grupo A:**

En nuestro estudio se detectó la expresión aberrante del antígeno de grupo histosanguíneo B en un COCE en paladar blando perteneciente a un paciente de grupo A. Este paciente había presentado seis años antes un COCE laríngeo y dos años antes un carcinoma en esta misma zona, que fue tratado con radioterapia y quimioterapia. En el seguimiento se observa que tres años después de haber tomado la biopsia vuelve a aparecer un COCE en esta misma zona con metástasis en ganglios cervicales y un año después se pierde el seguimiento del paciente. *Ver Foto 9.*



**Foto 9. Expresión aberrante del antígeno de grupo histo-sanguíneo B en un paciente de grupo sanguíneo A.** Véase la positividad de las células tumorales para el antígeno B y la negatividad para el mismo antígeno en vasos y hematíes (flecha azul).

Se ha observado como, en ocasiones, las células cancerosas son capaces de sintetizar y expresar antígenos de grupo sanguíneo extraños, por ejemplo en pacientes con fenotipo O y genotipo *OO* y cáncer de estómago, formando parte del proceso de la carcinogénesis<sup>(176)</sup>, ó expresión del antígeno A en individuos de grupo sanguíneo O y B en cáncer de estómago<sup>(177)</sup> y en hepatocarcinoma en un individuo de grupo O<sup>(178)</sup>.

También se ha descrito la aparición de estos antígenos incompatibles en cánceres de pecho, ovario, colon, páncreas y pulmón. Hasta donde nuestro conocimiento llega, en cánceres de cavidad oral no se ha publicado la aparición de este tipo de antígeno, por lo que en este sentido, nuestro hallazgo sería pionero en este campo. El significado biológico de la aparición de un antígeno incompatible no está claro, si bien el caso que presentamos se trata de un paciente con un COCE bastante resistente y recidivante, por lo que hipotéticamente podría tener relación con un comportamiento tumoral malo.

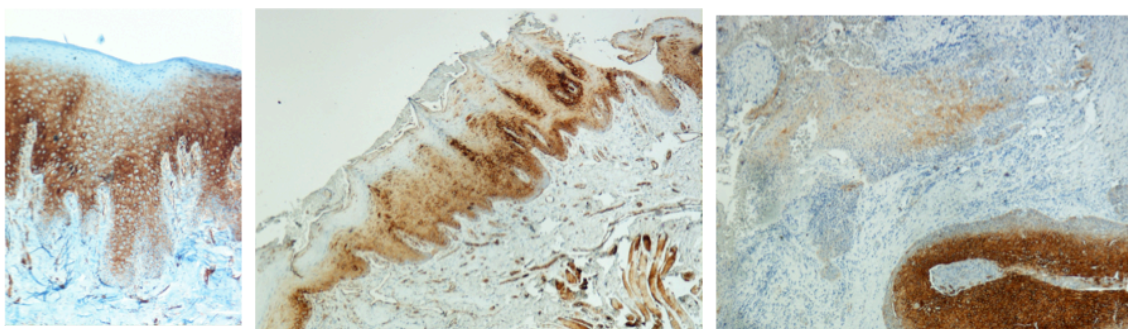
La contribución de las **Proteínas de Choque Térmico** en la carcinogénesis podría atribuirse a sus actividades pleiotrópicas como chaperonas moleculares aportando a las células cancerosas una oportunidad para alterar sus actividades proteicas, actuando en particular, sobre componentes del ciclo celular, kinasas y otras proteínas con influencia en el crecimiento de la célula tumoral<sup>(90)</sup>. Dentro de la población celular tumoral, las células cancerosas se ven expuestas a un ambiente estresante debido a la falta de nutrientes, a los cambios en el pH y a la falta de aporte sanguíneo que desencadenará una situación de anoxia que estimularía a la producción de *Hsps*<sup>(179)</sup>. La actividad fisiopatológica de las *Hsps* en cáncer no se conoce, pero se sabe que está relacionada con:

- el crecimiento y la diferenciación celular
- el gen supresor tumoral TP53
- la supresión de la apoptosis
- la participación en la respuesta inmune aumentando el reconocimiento inmunológico.

Los hallazgos más relevantes en relación con las *Hsps* en nuestro estudio fueron:

### **1. Marcada expresión de hsp27 en todos los grupos destacando el grupo control.**

En relación con la *hsp27* hemos encontrado una clara expresión en basal en todos los grupos, destacando el grupo control por una mayor intensidad en la expresión. Los mismos resultados se observan al analizar el estrato suprabasal. *Ver Foto 10.*



**Foto 10. Inmunohistoquímica de hsp27 en mucosa control, leucoplasia y COCE.** Véase la gran expresión de este antígeno en todos los grupos, especialmente la marcada intensidad en basal del grupo control(primer foto) y la menor intensidad en el área adyacente al COCE (tercera foto, esquina superior izquierda).

Las *pequeñas Hsps intracelulares* se han visto implicadas en los mecanismos de promoción de neoplasias a partir de sus propiedades de protección anti-oxidativa formando complejos estables y aumentando la tolerancia de las células tumorales al estrés oxidativo y a la quimioterapia. Destaca su función de protección frente a la apoptosis uniéndose a componentes clave en la cascada de la apoptosis, como el citocromo-c ó las caspasas, lo que permitiría la progresión tumoral y promoción hacia la metástasis, permitiendo la supervivencia de las células tumorales en el torrente sanguíneo. Por último, no hay que dejar de mencionar, su función de protección y estabilización del citoesqueleto frente a estímulos estresantes impidiendo también de este modo e indirectamente la muerte celular<sup>(97, 117)</sup>.

En el análisis de tejido oral normal el principal patrón de expresión de *hsp27* descrito ha sido variable, desde suprabasal<sup>(16, 101, 180)</sup>, con un aumento de expresión en los estratos más superiores<sup>(101, 180, 181)</sup>, con algún área positiva aislada en el estrato basal<sup>(101)</sup>, aunque algunos autores también refieren una expresión negativa en todos los estratos<sup>(182)</sup>. En mucosa oral de feto desde 10 a 16 semanas, se ha detectado una expresión negativa de *hsp27* en basal y una expresión moderada en suprabasal, comentando que esto podría deberse a que esa mucosa todavía no está sometida al estrés medioambiental, en comparación con la mayor expresión que detectaron en la mucosa oral inflamada, debida probablemente al mayor sometimiento a estrés<sup>(181)</sup>. En mucosa normal de esófago no se ha detectado expresión de *hsp27* en basal y sí en suprabasal y más aún en superficial<sup>(183)</sup>. En nuestro estudio la expresión en basal fue clara, ya que la diferencia en tinción fue neta con respecto al conjuntivo subepitelial y proporcionada

con respecto a la tinción obtenida en los estratos suprabasales, no pareciendo que se pudiera justificar por difusión del cromógeno.

Al analizar la expresión de *hsp27* en leucoplasias, Seoane y cols. observaron una tinción en el estrato basal en un número muy bajo y una expresión suprabasal en el 100% de los casos, no existiendo diferencias en función de la presencia de displasia epitelial tal y como han referido también otros autores<sup>(129, 181)</sup>. En áreas con displasia se ha detectado una expresión variable de *hsp27*, desde una expresión moderada/intensa tanto en el estrato basal como suprabasal<sup>(16)</sup>, una expresión variable entre débil y fuerte<sup>(182)</sup> y una expresión entre negativa y leve<sup>(181)</sup>.

En mucosa oral sin displasia adyacente a COCE se ha observado ausencia de expresión de *hsp27* en basal con marcada tinción en el estrato espinoso y granuloso y escasa tinción superficial<sup>(128)</sup>.

En COCEs la expresión de *hsp27* ha variado según los estudios desde positiva<sup>(184) (128)</sup> a débil ó negativa, siempre en el estrato suprabasal<sup>(184)</sup>, con expresión elevada en la mayoría de los casos<sup>(180-182)</sup>, con reducción en la expresión<sup>(101, 130)</sup>, con mayor expresión en las áreas diferenciadas y con expresión negativa ó leve en las áreas pobremente diferenciadas<sup>(16, 101, 180) (131, 181)</sup>. También se ha observado una disminución de *hsp27* al pasar de COCEs iniciales a avanzados<sup>(131, 181)</sup>.

En carcinomas escamosos de esófago se ha detectado una reducción en la expresión de *hsp27* en la mayoría de los tumores, asimismo en estos tumores hubo una mayor frecuencia de metástasis cuando la expresión de *hsp27* fue negativa y un mayor TNM correlacionado con la disminución en la expresión de *hsp27*<sup>(183)</sup>. También se ha observado en esófago una disminución progresiva de *hsp27* al pasar de mucosa normal a tejido metaplásico y a adenocarcinoma, mientras que se ha detectado una expresión entre moderada e intermedia en los carcinomas escamosos, reflejando el diferente origen de los tumores<sup>(185)</sup>.

En estudios *in vitro* se observó el efecto de *hsp27* en la regulación del potencial metastático en los tumores de cabeza y cuello, llegando a la conclusión de que una inhibición de *hsp27* disminuiría la motilidad y la capacidad invasiva de las células cancerosas, aunque la *hsp27* podría desempeñar diferentes roles según el tipo de cáncer<sup>(186)</sup>.

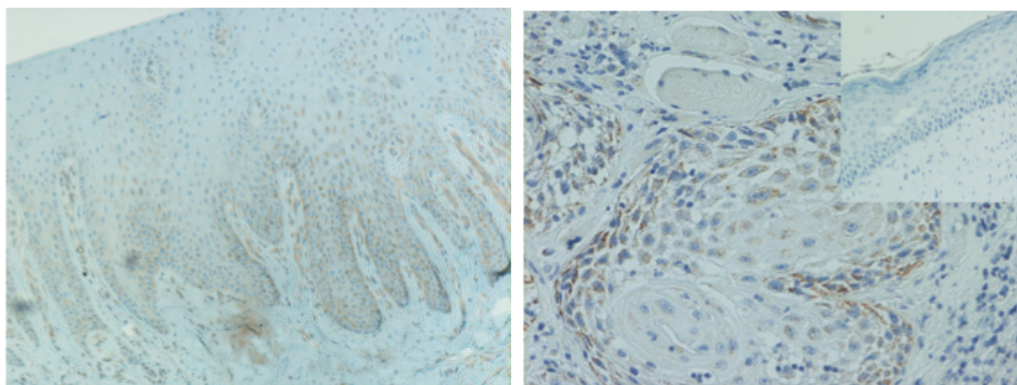
Se ha podido comprobar el papel protector de *hsp27* en el cáncer de cabeza y cuello dado que en aquellos pacientes que no expresaron *hsp27* hubo mayor recidiva tumoral tras el tratamiento previo con cirugía resectiva y radioterapia<sup>(187)</sup>.

La elevada expresión de HSPs en la células malignas juega un papel clave en la protección frente a la apoptosis espontánea asociada con la malignización, así como frente a la apoptosis inducida por la terapia<sup>(118)</sup>. El papel carcinogénico de *HSP70* y *HSP27* se ha asociado con sus propiedades antiapoptóticas<sup>(90)</sup>. En concreto, la *hsp27* se ha visto implicada en tres posibles mecanismos en la vía apoptótica mitocondrial, inhibición de la formación de las especies reactivas de oxígeno, aumento a niveles celulares de glutatión (ayuda a proteger a las células frente a los radicales libres de oxígeno), interacción con el *citocromo c* liberado de la mitocondria e inhibición de la vía de activación de la *caspasa 3* mediante interacción directa. Asimismo, en el mecanismo apoptótico asociado al receptor de la muerte, la *hsp27* inhibe la apoptosis dependiente de Fas y de Ask1<sup>(188)</sup>.

## **2. Mayor expresión de *hsp60* en el grupo control seguido del grupo de los COCEs.**

Analizando la expresión de *hsp60* en nuestro estudio se ha detectado en el estrato basal una mayor tinción en el grupo control y una pérdida de expresión en los grupos Áreas adyacentes, Leucoplasias y COCEs, si bien, la expresión en este último grupo fue mayor que en los dos anteriores. Los mismos resultados se observan al analizar el estrato suprabasal. Si bien destacar que la intensidad de expresión fue fundamentalmente leve. La pérdida de expresión en las Áreas adyacentes y en las Leucoplasias podría hacer al epitelio más vulnerable para sufrir los efectos de los factores causales que intervienen en la carcinogénesis. *Ver Foto 11.*





**Foto 11. Inmunohistoquímica de hsp60 en leucoplasia y COCE.** Se observa la escasa tinción general en todos los grupos. Véase la menos expresión de este antígeno en un área adyacente a un COCE( segunda foto, imagen reducida en esquina superior derecha), respecto al COCE donde se observa mayor tinción)

En mucosa normal se ha descrito una expresión de *hsp60* fuertemente positiva en suprabasal<sup>(182)</sup> mientras que en mucosa normal de esófago se ha descrito una expresión en basal y suprabasal<sup>(132)</sup>. En áreas con displasia se ha detectado una expresión de *hsp60* muy leve ó negativa<sup>(182)</sup>, coincidiendo con lo observado en nuestro estudio, mientras que otros autores han hallado una mayor expresión de *hsp60* en leucoplasias y COCEs al compararlos con la mucosa oral normal, no detectando diferencias estadísticamente significativas entre los COCEs y las leucoplasias con displasia de alto grado<sup>(133)</sup>. Ito y cols. hallaron una expresión fuertemente positiva en suprabasal en COCEs orales<sup>(182)</sup> mientras que Faried y cols. sólo encontraron tinción positiva en la mitad de los carcinomas de esófago<sup>(132)</sup>.

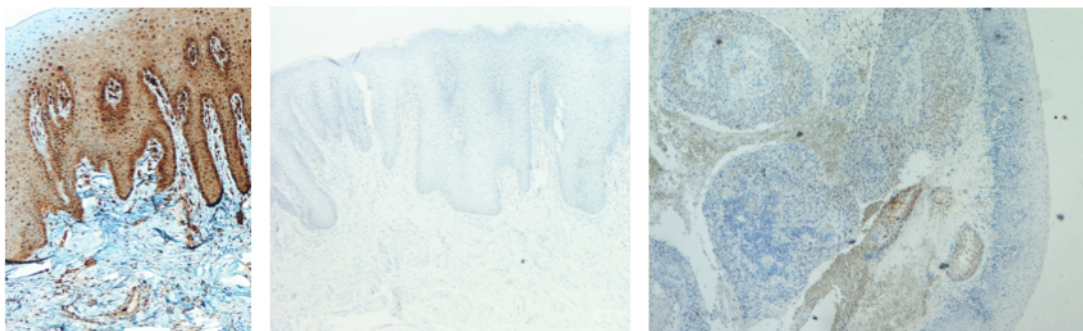
Se ha detectado un papel pro-apoptótico para la *hsp60* mediante el favorecimiento de la maduración de la proteína caspasa-3<sup>(189, 190)</sup>, mientras que en el caso de *hsp90* se ha detectado un papel anti-apoptótico mediante la formación de un complejo citosólico con Apaf-1 inhibiendo la oligomerización de c-Cyt y la activación de la procaspasa-9<sup>(191)</sup>.

### **3. Mayor expresión de hsp60 en el grupo control seguido del grupo de los COCEs.**

La *hsp70* muestra una tinción muy marcada en el estrato basal en el grupo control y una clara pérdida de expresión en los otros tres grupos. Los mismos resultados se observan al analizar el estrato suprabasal, aunque en este estrato el grupo de los COCEs muestra una mayor expresión que el grupo de las Áreas adyacentes. El hecho de



producirse esta pérdida de expresión podría hacer más vulnerable al tejido frente a los eventos carcinogénéticos. Ver Foto 12.



**Foto 12. Inmunohistoquímica de hsp70 en mucosa control, leucoplasia y COCE.** Se observa la escasa tinción en la leucoplasia y el COCE al compararlos con el grupo control. Véase la menor tinción en el Área adyacente al carcinoma respecto del COCE (tercera imagen, borde lateral derecho).

En mucosa normal la expresión de *hsp70* se ha descrito de forma variable desde una expresión débil tan sólo en suprabasal<sup>(179, 181, 182, 192, 193)</sup> hasta una expresión en todo el epitelio, en ocasiones con débil tinción en basal y aumento de la expresión en el estrato espinoso<sup>(194)</sup>, mientras que en lesiones benignas orales se observa la misma tinción pero con más intensidad probablemente relacionado con el estrés al que están sometidas estas lesiones<sup>(194)</sup>. En mucosa normal de esófago se detectó expresión positiva de *hsp70* en suprabasal y más aún en superficial, siendo la expresión negativa en basal<sup>(183)</sup>.

En mucosa sin displasia adyacente a COCE se ha observado una expresión de *hsp70* moderada en el estrato basal, suprabasal y granuloso con ausencia de expresión en el estrato superficial<sup>(128)</sup>, mientras que en mucosa oral con displasia se ha detectado una expresión de *hsp70* positiva entre débil y fuerte<sup>(182)</sup>, específicamente negativa en basal y positiva en espinoso profundo con tinción superficial variable sin diferencia entre los grados de displasia y con más intensidad que en la mucosa normal<sup>(194)</sup>. Por otro lado, Seoane y cols., detectan en 2006, una mayor expresión de *hsp70* en leucoplasias con displasia al compararlas con leucoplasias sin displasia<sup>(129)</sup>. En leucoplasia sin displasia se observa un aumento de expresión de *hsp70* en el estrato basal al compararlo con la expresión en el liquen plano oral sugiriendo el rol de *hsp70* en la patogénesis de la leucoplasia y no tanto en la del liquen plano oral<sup>(195)</sup>.

En COCEs se ha descrito una expresión de *hsp70* muy variable desde débilmente positiva en suprabasal<sup>(182)</sup>, positiva en todos los estratos y basal focal con

aumento ocasional de la expresión<sup>(194)</sup> hasta positiva, sin especificar más, en la mayoría de los tumores<sup>(128)</sup>. En relación al grado histológico de los tumores, la mayoría de los autores refieren un aumento de expresión de *hsp70* a medida que aumenta la dediferenciación tumoral<sup>(192) (193)</sup>, mientras que Sugerman y cols. encontraron lo contrario, es decir, una disminución de *hsp70* a medida que aumentaba la dediferenciación tumoral<sup>(194)</sup> ó Mese y cols.,que no encuentran correlación<sup>(184)</sup>. Asimismo se ha observado una mayor expresión de *hsp70* a medida que aumenta el TNM<sup>(193)</sup> y en la progresión hacia la malignidad<sup>(179, 193)</sup>.

En carcinomas escamosos de esófago se detectó una reducción en la expresión de *hsp70* en la mayoría de los tumores así como un riesgo mayor de metástasis cuando la expresión *hsp70* fue negativa<sup>(183)</sup>, mientras que en pacientes con fibrosis oral submucosa se ha observado un aumento en la expresión de *hsp70* al compararlo con la mucosa oral normal y un aumento de expresión al pasar de fibrosis submucosa a COCE<sup>(196)</sup>.

En relación con la expresión de *hsp70* y el riesgo de metástasis tumoral, Mese y cols. no detectaron correlación<sup>(184)</sup>, mientras que Lee y cols. observan asociación entre la disminución de *hsp70* y el aumento en el riesgo de metástasis<sup>(192)</sup> y Kaur y cols. observan lo contrario, es decir, una asociación entre la sobreexpresión de *hsp70* y el riesgo de metástasis<sup>(193)</sup>.

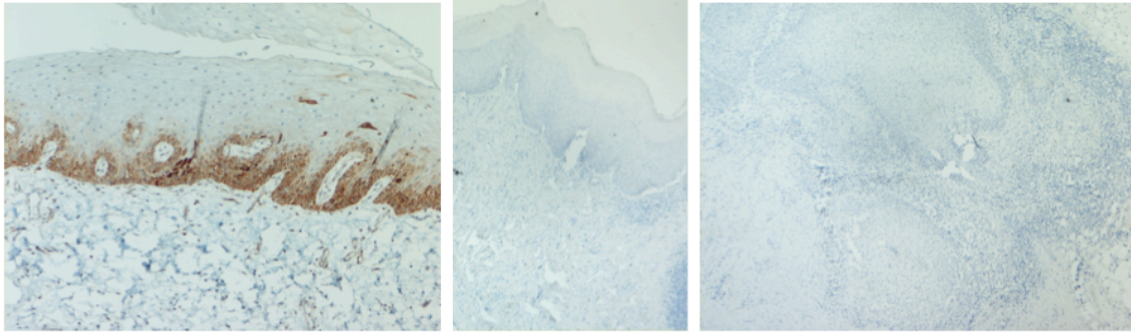
Dada la alta frecuencia de mutaciones detectadas de *p53* en COCEs y sabiendo que *p53* es el producto del gen supresor tumoral TP53 cuya función es la regulación negativa del ciclo celular, así como teniendo en mente que *p53* lleva a cabo su actividad biológica mediante la formación de complejos con varias proteínas, el grupo de Kaur y cols., lleva a cabo varios estudios para analizar las posibilidades de coimmunoprecipitación de *p53* y *hsp70*, detectando la formación de complejos entre *p53* y *hsp70* mediante una unión física en COCEs y en displasias y no en mucosa oral normal<sup>(197)</sup>. Posteriormente y mediante la detección en el suero de los pacientes con COCEs y displasias del anticuerpo anti-*p53*, junto con niveles elevados de complejos *p53-hsp70* sugieren un papel para la *hsp70* como proteína presentadora antigénica de *p53*<sup>(198)</sup>. El hecho de que mediante citometría de flujo Kaur y cols. demostraran la presencia de la *hsp70* en la superficie celular observando una mayor expresión en el supuesto camino hacia la malignidad a medida que se pasaba de mucosa normal a

displasia y de esta situación a carcinoma, así como a medida que aumentaba la severidad de la displasia y la pérdida de diferenciación y tamaño del tumor, indica que dada la localización en la superficie celular de *hsp70* podría actuar como un péptido encargado de la translocalización de la *p53* mutante y mediante la formación de los complejos se podría evitar la activación de la respuesta inmune frente al antígeno *p53*<sup>(199)</sup>. Para saber específicamente el papel de *hsp70* en la oncogénesis oral, se lleva a cabo un experimento mediante el cual se bloquea la expresión de *hsp70* utilizando anticuerpos específicos aplicados a células de cáncer oral. Los fenómenos observados fueron la inhibición de la proliferación celular y la inducción de apoptosis, este último fenómeno posiblemente provocado por la disrupción de los complejos *p53/bcl-2*<sup>(200)</sup> y por la inhibición de NF-kappa-B<sup>(201)</sup>, indicando el rol de *hsp70* en la proliferación y supervivencia de las células tumorales. Se piensa que al formarse los complejos de *hsp70* con el producto del gen supresor tumoral *p53* se extiende la vida media de las proteínas *p53* mutantes, lo que explicaría la acumulación de estas proteínas en las células tumorales<sup>(202)</sup>. Por otro lado, la asociación de *hsp70* con el oncogén *c-myc* inhibiría el ciclo celular de la célula tumoral resultando en un aumento en la diferenciación de las células tumorales<sup>(203)</sup>.

Mediante análisis de perfiles proteicos, *hsp70* y *hsp90* se han identificado como proteínas capaces de discriminar entre tejido canceroso de lengua y tejido normal de lengua. Además se ha observado que *hsp70* es un marcador fundamental ya que presenta numerosas interacciones con otras proteínas confirmando su papel fundamental en la carcinogénesis de las células escamosas<sup>(204)</sup>.

#### **4. Ausencia de expresión de *hsp90* en el grupo de los COCEs, Áreas adyacentes y Leucoplasias.**

Con *hsp90* se observa una clara pérdida de expresión en los grupos de COCEs, Áreas adyacentes y Leucoplasias, mientras que en el grupo control la tinción fue del 100%, tanto en el estrato basal como en el suprabasal. *Ver Foto 13.*



**Foto 13. Inmunohistoquímica de *hsp90* en mucosa control, leucoplasia y COCE.** Se observa una mayor expresión en el grupo control (primera imagen) respecto del resto de los grupos.

En la literatura científica se ha descrito una expresión negativa de *hsp90* en mucosa oral normal<sup>(182)</sup> mientras que en mucosa normal de esófago hubo expresión tanto en el estrato basal como en el suprabasal<sup>(132)</sup>. En lesiones con displasia se ha detectado una expresión de *hsp90* entre débil y positiva<sup>(182)</sup> y en COCE se ha detectado una expresión de *hsp90* desde fuertemente positiva en suprabasal en la mayoría de los COCEs<sup>(182)</sup>, hasta una tinción difusa en tan sólo la mitad de los casos de carcinoma escamoso de esófago<sup>(132)</sup>. El papel que la *hsp90* ejerce en el cáncer oral viene correlacionado con las características de protección de las células dañadas actuando como chaperonas moleculares, mecanismo común con otras *Hsps*, aunque también se ha descrito su asociación con la permisión de la acumulación de las mutaciones genéticas inherentes<sup>(109)</sup>.

La gran variabilidad en los resultados al comparar unos estudios con otros puede deberse a las diferencias en los estudios por distintos protocolos, distintos anticuerpos y la variación en la definición de los niveles de expresión, entre otras causas.

**5. Los patrones de tinción horizontal se correlacionaron positivamente con la intensidad de la tinción que a su vez, al menos hipotéticamente, se puede asociar con la cantidad de antígeno presente.**

Cuando se detectaron los patrones Focal y Parcheado ó Focal y Completo, la tinción tuvo un rango amplio de intensidad desde débil a intensa y si la tinción siguió el patrón Difuso Completo la intensidad mostró un grado moderado/alto. Se han descrito patrones de expresión en mosaico respecto a la expresión de *hsp27* en COCEs<sup>(101)</sup> y en

áreas displásicas<sup>(181)</sup> . Estos patrones se corresponderían con los patrones focal y/o parcheado de nuestra clasificación horizontal. El significado de la interrupción de la expresión del antígeno en columnas de queratinocitos dentro de áreas positivas al igual que lo observado con los antígenos sanguíneos permanece desconocido.

**6. Respecto a la localización intracelular de la tinción, las *hsp27*, *hsp60* y *hsp90* expresaron una tinción fundamentalmente citoplasmática, mientras que la *hsp70* presentó una tinción fundamentalmente citoplasmática y nuclear.** La mayoría de los autores refieren una localización intracelular de la tinción similar a la observada en nuestro estudio. Otros autores refieren hallazgos interesantes como Seoane y cols. que observaron una tinción nuclear de *hsp70* estadísticamente significativamente mayor en el grupo de leucoplasias con displasia que en el grupo de leucoplasias sin displasia<sup>(129)</sup> ó Kaur y cols. que detectan expresión membranosa de *hsp70* específicamente en algún COCE<sup>(179)</sup> ó la expresión de *hsp60* en carcinomas de esófago formando gránulos gruesos<sup>(132)</sup>.

**7. Al buscar las posibles asociaciones entre la expresión dicotómica de los antígenos sanguíneos y otras variables encontramos lo siguiente:**

- El grupo de los carcinomas mixtos (CM) no expresó ni *hsp60*, *hsp70* ni *hsp90*, si bien hay que tener en cuenta que sólo hubo dos casos . Este hallazgo detectado en los carcinomas mixtos no puede ser interpretado, pero si abre la puerta a diferentes hipótesis de las cuales la más plausible es que se produzca una selección clonal de las células proliferantes, de tal forma que los clones proliferantes tuvieran fenotipo negativo y dominan a los otros clones, o que simplemente no están en el mismo corte analizado.

- En relación con *hsp90* se observan varios hallazgos interesantes:

- Los especímenes pertenecientes a pacientes con enfermedades coadyuvantes expresan más *hsp90* que los que no tienen otras enfermedades.
- Los especímenes pertenecientes a pacientes no fumadores expresan más *hsp90* que los fumadores.
- En el dorso lingual y en Encía queratinizada se expresa más *hsp90* que en otras localizaciones anatómicas.

- Los pacientes sin tumores previos y los que no han desarrollado tumores posteriores expresan más *hsp90* que los que han tenido tumores previos o han desarrollado tumores posteriores.

La explicación de estas asociaciones se hace difícil por la escasez de literatura científica. La mayor expresión en caso de padecer enfermedades coadyuvantes, podría relacionarse con el aumento de *hsp90* en las situaciones de estrés. Por otro lado, se sabe que la consumición de tabaco aumenta la producción de radicales libres, causa inmunosupresión y provoca estrés. Es probable que los constituyentes carcinogénicos del tabaco que interaccionan con dianas biológicas, bien directamente ó tras la activación metabólica, provoquen estrés celular que induzca la expresión de las Hsps<sup>(193)</sup> lo que no podría explicar el mayor aumento de *hsp90* en no fumadores. Sin embargo, en relación con la *hsp70* se ha visto sobreexpresión en fumadores<sup>(193)</sup>, especialmente con displasia<sup>(179)</sup>, indicando probablemente un estado biológico de estrés. La mayor localización de *hsp90* en dorso lingual, así como en encía queratinizada junto con la mayor detección de la misma en pacientes que no han tenido tumores previos ni han desarrollado tumores posteriores, podría implicar para la *hsp90* el tener un cierto papel protector, si bien el mecanismo de actuación permanece desconocido.

Con el resto de las variables no se detectó alguna influencia en relación con las Proteínas de Choque Térmico. Por otro lado, Kaur y cols. detectaron una sobreexpresión de *hsp70* y un mayor riesgo de recidiva tumoral<sup>(193)</sup>.

## **8. El análisis de supervivencia no demostró asociación con ninguna de las proteínas de choque térmico.**

En este sentido, otros autores si han encontrado asociación, pudiendo considerarse que la variación en el número de casos y los puntos de corte de positividad seleccionados pueden influir en la variación de los resultados.

En relación con la expresión de *hsp27* y la supervivencia los resultados son controvertidos, ya que hay autores que han detectado una menor supervivencia en pacientes con COCEs con expresión positiva de *hsp27*<sup>(184)</sup>, mientras que otros detectan exactamente lo contrario, es decir, que la sobreexpresión de *hsp27* en los COCEs se correlacionó con un mejor pronóstico<sup>(16, 101, 130, 180, 182)</sup>. La mayoría de nuestros COCEs tuvieron expresión positiva de *hsp27*, por lo que discernir en el análisis de

supervivencia no ha sido viable. Asimismo se ha detectado un mayor efecto del tratamiento quimioterapéutico en los COCEs en los que hubo sobreexpresión de *hsp27*<sup>(180)</sup>.

No se ha detectado una influencia de *hsp60* en la supervivencia en COCEs<sup>(133)</sup>, sin embargo, la expresión negativa de *hsp60* en el carcinoma escamoso de esófago se ha asociado con una baja supervivencia aunque individualmente no demostró ser un factor pronóstico<sup>(132)</sup>.

En pacientes con COCE en estadio T1óT2 la supervivencia fue 8 veces mayor cuando la expresión de *hsp70* fue positiva<sup>(205)</sup>. En el carcinoma escamosos de esófago los pacientes con expresión negativa de *hsp27* y *hsp70* tuvieron menor supervivencia demostrando correlación entre *hsp27* y *hsp70*<sup>(183)</sup>.

La controversia en los resultados puede resultar por la existencia de diferentes vías oncogénicas que pueden acabar en el mismo tipo de cáncer y que pueden asociarse con distintos factores de riesgo y con diferentes características genéticas ya que en el COCE no estamos tratando con un único y simple evento etiológico<sup>(16)</sup>. Tumores con una patología similar pueden expresar diferentes comportamientos biológicos al emerger en diferentes tejidos<sup>(131, 181)</sup>.

Hay que tener en cuenta que las células tumorales producen patrones alterados de citoqueratinas y otros productos proteicos y que, por el hecho de que varias *Hsps* estén implicadas en la síntesis proteica, ensamblaje y translocación, un aumento en la expresión de las mismas en el cáncer oral podría ser simplemente un epifenómeno relacionado con la síntesis de una variedad de proteínas por las células tumorales más que un marcador de malignidad *per se*.

En el **análisis de supervivencia** el hecho de desarrollar un tumor posterior pareció influir negativamente en los resultados, hecho que podría explicarse por alteración sistémica que produce el tumor en sí ó de la cuál deriva el mismo. Asimismo el ser hombre parecería tener alguna tendencia genética protectora, no obstante el mecanismo no está claro. En relación a la influencia negativa de las lesiones desarrolladas en encía queratinizada, se ha descrito que el epitelio no-queratinizado es menos protector y más vulnerable a los carcinógenos del tabaco y alcohol que el epitelio

queratinizado. Como consecuencia, la aparición de carcinomas idiopáticos en el epitelio queratinizado es mayor y se comportan más agresivamente que aquellos asociados a factores etiológicos. Otros factores como la estructura de los tejidos subepiteliales y el drenaje linfático pueden afectar al comportamiento de los COCEs. El epitelio masticatorio queratinizado de la encía y del paladar duro tiene hueso en una proximidad muy cercana al conectivo. Consecuentemente, incluso tumores pequeños pueden invadir el hueso subyacente, agravando la enfermedad, ya que la invasión del hueso suele predecir un mal pronóstico. Aunque por otro lado se ha descrito que a pesar de la existencia de invasión ósea los factores asociados con el tejido blando son más importantes a la hora de predecir el pronóstico del COCE<sup>(5)</sup>.

Con el **árbol de decisiones** se muestra una gran capacidad discriminatoria para la *hsp90*, hecho que se asocia con la mayor expresión obtenida en el grupo control frente a la ausencia de expresión en los otros grupos. No obstante hay que resaltar que el hecho de que la *hsp90* haya sido tan positiva puede haber enmascarado la influencia de las otras variables, ya que con el árbol se hace un estricto cribado seleccionando únicamente la mejor de las variables. Asimismo la influencia estadísticamente significativa de las variables tumor posterior y expresión dicotómica del antígeno de grupo A, no desentona con los hallazgos de este trabajo descritos en apartados anteriores.

Reconocemos como limitación de nuestro estudio el número de especímenes pertenecientes al grupo control. Los criterios habitualmente admitidos corresponden a un ratio de 2-4 casos control por caso problema, lo cual supone una cierta limitación en nuestro estudio debida fundamentalmente a la dificultad de obtención de muestras clínica y microscópicamente normales. Dada la necesidad de obtener especímenes con ausencia prácticamente total de inflamación, de los 70 especímenes obtenidos 29 fueron descartados por no cumplir con este criterio de inclusión. Creemos, por tanto, que la rigurosa selección de los pacientes puede compensar, al menos en parte, el número inferior al óptimo de casos normales utilizados como controles.

Respecto a las condiciones de fijación y de preservación de la actividad antigénica de los tejidos, se ha pretendido que sean similares, para lo cual se han utilizado casos en los que las condiciones de fijación, procesamiento y almacenamiento



del tejido sean lo más homogéneas posibles. Si bien esta limitación es aplicable a la totalidad de las series publicadas.

Dentro del **plan de trabajo futuro** se pretende obtener un aumento de la muestra global, así como profundizar en el algoritmo del árbol de toma de decisiones y estudiar mediante microdisección tisular las diferencias entre los campos con positividad alternante.

## V. CONCLUSIONES

The following conclusions derive from the all information described above:

1. It has been detected different patterns of expression with the antigens analysed depending on the type of histological lesion. In this sense the most relevant events were the loss of expression of the histo-blood group antigen A in Oral Squamous Cells Carcinomas (OSCCs), the aberrant expression of group B detected in an patient with OSCC belonging to group A and the total loss of *hsp90* expression in all groups except for the control group.
2. It has been detected different patterns of expression with the antigens analysed depending on the grade of dysplasia.
3. It has been detected some associations between the positive or negative expression of some of the antigens analysed and certain variables.
4. Belonging to group B and suffering from a future tumour were the more influential variables in the survival analysis.
5. *Hsp90* demonstrated to be the more capable variable to discern between the four main groups analysed in this study.
6. There is an urgent need for standardized protocols to homogenize the results obtained from the different studies or to make them more comparable.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Barnes L, Eveson J, Reichart PA, Sidransky D. Head and neck tumours. World Health Organization Classification of tumours Pathology & Genetics International Agency for Research on Cancer (IARC). Lyon: IARC Press; 2005. p. 177-80.
2. Bascones Martinez A. Cáncer de la mucosa bucal. En: Medicina bucal. 3ª Edición. Editorial Ariel S.A. 2004:253-72.
3. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. Oral Oncol. 2009 Apr-May;45(4-5):309-16.
4. García-Pola M. Cáncer oral. Magnitud del problema en España. RCOE. 2009;14(2):167-70.
5. Rautava J, Luukkaa M, Heikinheimo K, Alin J, Grenman R, Happonen RP. Squamous cell carcinomas arising from different types of oral epithelia differ in their tumor and patient characteristics and survival. Oral Oncol. 2007 Oct;43(9):911-9.
6. Martorell-Calatayud A, Botella-Estrada R, Bagan-Sebastian JV, Sanmartin-Jimenez O, Guillen-Barona C. Oral leukoplakia: clinical, histopathologic, and molecular features and therapeutic approach. Actas Dermosifiliogr. 2009 Oct;100(8):669-84.
7. Petti S. Lifestyle risk factors for oral cancer. Oral Oncol. 2009 Apr-May;45(4-5):340-50.
8. La Vecchia C. Mouthwash and oral cancer risk: an update. Oral Oncol. 2009 Mar;45(3):198-200.
9. Meyer MS, Joshipura K, Giovannucci E, Michaud DS. A review of the relationship between tooth loss, periodontal disease, and cancer. Cancer Causes Control. 2008 Nov;19(9):895-907.
10. da Silva SD, Ferlito A, Takes RP, Brakenhoff RH, Valentin MD, Woolgar JA, et al. Advances and applications of oral cancer basic research. Oral Oncol. 2011 Sep;47(9):783-91.
11. Syrjanen S, Lodi G, von Bultzingslowen I, Aliko A, Arduino P, Campisi G, et al. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. Oral Dis. 2011 Apr;17 Suppl 1:58-72.
12. Bouquot JE, Ephros H. Erythroplakia: the dangerous red mucosa. Pract Periodontics Aesthet Dent. 1995 Aug;7(6):59-67; quiz 8.
13. Cuenca E, Baca P. Cáncer oral: Epidemiología y prevención. En: Odontología preventiva y comunitaria. Barcelona: Masson; 2005. p. 195-211.
14. Bagán JV, Scully C. Tumores malignos de los tejidos blandos orales. En: Medicina y Patología oral. Valencia: Editorial Medicina Oral; 2006. p. 127-44.
15. Lesch CA, Squier CA, Cruchley A, Williams DM, Speight P. The permeability of human oral mucosa and skin to water. J Dent Res. 1989 Sep;68(9):1345-9.
16. Wang A, Liu X, Sheng S, Ye H, Peng T, Shi F, et al. Dysregulation of heat shock protein 27 expression in oral tongue squamous cell carcinoma. BMC Cancer. 2009;9:167.
17. Sapp J, Eversole L, Wysochi G. Trastornos epiteliales En: Patología Oral y Maxilofacial Contemporánea 2ª Edición. Madrid: Elsevier, Mosby; 2004. p. 164-204.
18. Hahn WC, Weinberg RA. Modelling the molecular circuitry of cancer. Nat Rev Cancer. 2002 May;2(5):331-41.
19. Zhu CQ, Shih W, Ling CH, Tsao MS. Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach to marker evaluation. J Clin Pathol. 2006 Aug;59(8):790-800.
20. Thomson PJ, Hamadah O. Cancerisation within the oral cavity: the use of 'field mapping biopsies' in clinical management. Oral Oncol. 2007 Jan;43(1):20-6.

21. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*. 1953 Sep;6(5):963-8.
22. Clausen F, Poulsen H. Metastatic carcinoma of the jaws *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1963;57:361-74.
23. Ambrosch P, Kron M, Fischer G, Brinck U. Micrometastases in carcinoma of the upper aerodigestive tract: detection, risk of metastasizing, and prognostic value of depth of invasion. *Head Neck*. 1995 Nov-Dec;17(6):473-9.
24. Warnakulasuriya S JN, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. 2007;36:575-80.
25. Neville Brad W DTA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin*. 2002;52:195-215.
26. Axell T PJ, Smith CJ, Van der Waal I. Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco-related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18-21 1994. International Collaborative Group on Oral White Lesions. *J Oral Pathol Med*. 1996;25:49.
27. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol*. 2009 Apr-May;45(4-5):317-23.
28. Napier SS, Speight PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J Oral Pathol Med*. 2008 Jan;37(1):1-10.
29. Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol*. 2003 Dec;39(8):770-80.
30. Mascarenhas AK, Allen CM, Moeschberger ML. The association between Viadent use and oral leukoplakia--results of a matched case-control study. *J Public Health Dent*. 2002 Summer;62(3):158-62.
31. Auluck A, Pai KM. (Mis)Interpretations of leukoplakia. *J Can Dent Assoc*. 2005 Apr;71(4):237-8.
32. Cerero-Lapiedra R, Balade-Martinez D, Moreno-Lopez LA, Esparza-Gomez G, Bagan JV. Proliferative verrucous leukoplakia: a proposal for diagnostic criteria. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. Feb 21.
33. van der Waal I, Axell T. Oral leukoplakia: a proposal for uniform reporting. *Oral Oncol*. 2002 Sep;38(6):521-6.
34. Pindborg JJ, Jolst O, Renstrup G, Roed-Petersen B. Studies in oral leukoplakia: a preliminary report on the period prevalence of malignant transformation in leukoplakia based on a follow-up study of 248 patients. *J Am Dent Assoc*. 1968 Apr;76(4):767-71.
35. Schepman K, der Meij E, Smeele L, der Waal I. Concomitant leukoplakia in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis*. 1999 Jul;5(3):206-9.
36. Silverman S, Jr., Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer*. 1984 Feb 1;53(3):563-8.
37. Silverman S, Jr. Observations on the clinical characteristics and natural history of oral leukoplakia. *J Am Dent Assoc*. 1968 Apr;76(4):772-7.
38. Haya-Fernandez MC, Bagan JV, Murillo-Cortes J, Poveda-Roda R, Calabuig C. The prevalence of oral leukoplakia in 138 patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis*. 2004 Nov;10(6):346-8.
39. Cowan CG, Gregg TA, Napier SS, McKenna SM, Kee F. Potentially malignant oral lesions in northern Ireland: a 20-year population-based perspective of malignant transformation. *Oral Dis*. 2001 Jan;7(1):18-24.

40. Mashberg A, Morrissey JB, Garfinkel L. A study of the appearance of early asymptomatic oral squamous cell carcinoma. *Cancer*. 1973 Dec;32(6):1436-45.
41. Bouquot JE, Weiland LH, Kurland LT. Leukoplakia and carcinoma in situ synchronously associated with invasive oral/oropharyngeal carcinoma in Rochester, Minn., 1935-1984. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1988 Feb;65(2):199-207.
42. Shibuya H, Amagasa T, Seto K, Ishibashi K, Horiuchi J, Suzuki S. Leukoplakia-associated multiple carcinomas in patients with tongue carcinoma. *Cancer*. 1986 Feb 15;57(4):843-6.
43. Kramer IR, Lucas RB, Pindborg JJ, Sobin LH. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1978 Oct;46(4):518-39.
44. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. *Oral Oncol*. 2010 Jun;46(6):423-5.
45. Holmstrup P, Vedtofte P, Reibel J, Stoltze K. Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. *Oral Oncol*. 2006 May;42(5):461-74.
46. Ho PS, Chen PL, Warnakulasuriya S, Shieh TY, Chen YK, Huang IY. Malignant transformation of oral potentially malignant disorders in males: a retrospective cohort study. *BMC Cancer*. 2009;9:260.
47. Kramer IR. Oral leukoplakia. *J R Soc Med*. 1980 Nov;73(11):765-7.
48. Lodi G, Sardella A, Bez C, Demarosi F, Carrassi A. Interventions for treating oral leukoplakia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006(4):CD001829.
49. Kuffer R, Lombardi T. Premalignant lesions of the oral mucosa. A discussion about the place of oral intraepithelial neoplasia (OIN). *Oral Oncol*. 2002 Feb;38(2):125-30.
50. Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med*. 2008 Mar;37(3):127-33.
51. Oshimura M, Fitzgerald DJ, Kitamura H, Nettesheim P, Barrett JC. Cytogenetic changes in rat tracheal epithelial cells during early stages of carcinogen-induced neoplastic progression. *Cancer Res*. 1988 Feb 1;48(3):702-8.
52. Fleskens S, Slootweg P. Grading systems in head and neck dysplasia: their prognostic value, weaknesses and utility. *Head Neck Oncol*. 2009;1:11.
53. Smith J, Rattay T, McConkey C, Helliwell T, Mehanna H. Biomarkers in dysplasia of the oral cavity: a systematic review. *Oral Oncol*. 2009 Aug;45(8):647-53.
54. Lumerman H, Freedman P, Kerpel S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995 Mar;79(3):321-9.
55. Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(1):47-62.
56. Steinbeck RG. Atypical mitoses in lesions of the oral mucosa: a new interpretation of their impact upon tumorigenesis. *Oral Oncol*. 1997 Mar;33(2):110-8.
57. Crissman JD, Gnepp DR, Goodman ML, Hellquist H, Johns ME. Preinvasive lesions of the upper aerodigestive tract: histologic definitions and clinical implications (a symposium). *Pathol Annu*. 1987;22 Pt 1:311-52.
58. Guillaud M, Zhang L, Poh C, Rosin MP, MacAulay C. Potential use of quantitative tissue phenotype to predict malignant risk for oral premalignant lesions. *Cancer Res*. 2008 May 1;68(9):3099-107.

59. Fischer DJ, Epstein JB, Morton TH, Schwartz SM. Interobserver reliability in the histopathologic diagnosis of oral pre-malignant and malignant lesions. *J Oral Pathol Med.* 2004 Feb;33(2):65-70.
60. Holmstrup P, Vedtofte P, Reibel J, Stoltze K. Oral premalignant lesions: is a biopsy reliable? *J Oral Pathol Med.* 2007 May;36(5):262-6.
61. Scully C, Sudbo J, Speight PM. Progress in determining the malignant potential of oral lesions. *J Oral Pathol Med.* 2003 May;32(5):251-6.
62. Chimenos-Kustner E, Font-Costa I, Lopez-Lopez J. Oral cancer risk and molecular markers. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2004 Nov-Dec;9(5):381-4; 77-80.
63. Dean L. Blood Groups and Red Cell Antigens [Internet] Maryland: National Library of Medicine, NCBI; 2005.
64. Daniels GL, Fletcher A, Garratty G, Henry S, Jorgensen J, Judd WJ, et al. Blood group terminology 2004: from the International Society of Blood Transfusion committee on terminology for red cell surface antigens. *Vox Sang.* 2004 Nov;87(4):304-16.
65. Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Stanley P, Bertozzy C, et al. Essentials of Glycobiology. 2<sup>a</sup> Edición. New York: Cold spring Harbor; 2009.
66. Yip SP. Single-tube multiplex PCR-SSCP analysis distinguishes 7 common ABO alleles and readily identifies new alleles. *Blood.* 2000 Feb 15;95(4):1487-92.
67. Garratty G, Glynn SA, McEntire R. ABO and Rh(D) phenotype frequencies of different racial/ethnic groups in the United States. *Transfusion.* 2004 May;44(5):703-6.
68. Dabelsteen E, Gao S. ABO blood-group antigens in oral cancer. *J Dent Res.* 2005 Jan;84(1):21-8.
69. Letts JA, Rose NL, Fang YR, Barry CH, Borisova SN, Seto NO, et al. Differential recognition of the type I and II H antigen acceptors by the human ABO(H) blood group A and B glycosyltransferases. *J Biol Chem.* 2006 Feb 10;281(6):3625-32.
70. Oriol R, Mollicone R, Coullin P, Dalix AM, Candelier JJ. Genetic regulation of the expression of ABH and Lewis antigens in tissues. *APMIS Suppl.* 1992;27:28-38.
71. Oriol R, Candelier JJ, Mollicone R. Molecular genetics of H. *Vox Sang.* 2000;78 Suppl 2:105-8.
72. Dabelsteen E, Mandel U, Clausen H. Cell surface carbohydrates are markers of differentiation in human oral epithelium. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991;2(4):493-507.
73. Moro-Rodriguez E, Alvarez-Fernandez E. Losses of expression of the antigens A, Lea and Lex and over-expression of Ley in carcinomas and HG-SIL of the uterine cervix. *Diagn Pathol.* 2008;3:38.
74. Dabelsteen E, Vedtofte P, Hakomori S, Young WW, Jr. Accumulation of a blood group antigen precursor in oral premalignant lesions. *Cancer Res.* 1983 Mar;43(3):1451-4.
75. Ebnet K, Vestweber D. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochem Cell Biol.* 1999 Jul;112(1):1-23.
76. Roseman S. Reflections on glycobiology. *J Biol Chem.* 2001 Nov 9;276(45):41527-42.
77. Blumenfeld O, Patnaik S. Allelic genes of blood group antigens: a source of human mutations and cSNPs documented in the Blood Group Antigen Gene Mutation Database. *Human Mutation.* 2004;23(1):8-16.
78. Kiyoshi F. Glycoprotein. Tokio: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/glycoprotein/GPA04E.html>; 2005 [updated 2010].

79. Suadicanì P, Hein HO, Gyntelberg F. Airborne occupational exposure, ABO phenotype and risk of ischaemic heart disease in the Copenhagen Male Study. *J Cardiovasc Risk*. 2002 Aug;9(4):191-8.
80. Suadicanì P, Hein HO, Gyntelberg F. Airborne occupational exposure, ABO phenotype, and risk of obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2005 Jun;29(6):689-96.
81. Suadicanì P, Hein HO, Gyntelberg F. ABO phenotypes and inflammation-related predictors of lung cancer mortality: the Copenhagen Male Study - a 16-year follow-up. *Eur Respir J*. 2007 Jul;30(1):13-20.
82. Osborne RH, DeGeorge FV. The ABO blood groups in neoplastic disease of the ovary *Am J Hum Genet*. 1963 Dec;15:380-8.
83. Osborne RH, De George FV. The ABO blood groups in parotid and submaxillary gland tumors. *Am J Hum Genet*. 1962 Jun;14:199-209.
84. Ito N, Hirota T. Histochemical and cytochemical localization of blood group antigens. *Prog Histochem Cytochem*. 1992;25(2):1-85.
85. Henry S, Oriol R, Samuelsson B. Lewis histo-blood group system and associated secretory phenotypes. *Vox Sang*. 1995;69(3):166-82.
86. Matsumoto S, Imaeda Y, Umemoto S, Kobayashi K, Suzuki H, Okamoto T. Cimetidine increases survival of colorectal cancer patients with high levels of sialyl Lewis-X and sialyl Lewis-A epitope expression on tumour cells. *Br J Cancer*. 2002 Jan 21;86(2):161-7.
87. van de Vijver E, Maddalena A, Sanal O, Holland SM, Uzel G, Madkaikar M, et al. Hematologically important mutations: leukocyte adhesion deficiency (first update). *Blood Cells Mol Dis*. 2012 Jan 15;48(1):53-61.
88. Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet*. 1988;22:631-77.
89. Schlesinger MJ. Heat shock proteins. *J Biol Chem*. 1990 Jul 25;265(21):12111-4.
90. Schmitt E, Gehrmann M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol*. 2007 Jan;81(1):15-27.
91. Hightower LE, Hendershot LM. Molecular chaperones and the heat shock response at Cold Spring Harbor. *Cell Stress Chaperones*. 1997 Mar;2(1):1-11.
92. Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones*. 2009 Jan;14(1):105-11.
93. Asea A. Stress proteins and initiation of immune response: chaperokine activity of hsp72. *Exerc Immunol Rev*. 2005;11:34-45.
94. Samali A, Cotter TG. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Exp Cell Res*. 1996 Feb 25;223(1):163-70.
95. Ellis J. Proteins as molecular chaperones. *Nature*. 1987 Jul 30-Aug 5;328(6129):378-9.
96. Tsan MF, Gao B. Heat shock protein and innate immunity. *Cell Mol Immunol*. 2004 Aug;1(4):274-9.
97. Laudanski K, Wyczzechowska D. The distinctive role of small heat shock proteins in oncogenesis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2006 Mar-Apr;54(2):103-11.
98. Ciocca DR, Stati AO, Fanelli MA, Gaestel M. Expression of heat shock protein 25,000 in rat uterus during pregnancy and pseudopregnancy. *Biol Reprod*. 1996 Jun;54(6):1326-35.
99. Lavoie JN, Gingras-Breton G, Tanguay RM, Landry J. Induction of Chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. *HSP27*

- stabilization of the microfilament organization. *J Biol Chem*. 1993 Feb 15;268(5):3420-9.
100. Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, et al. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J Biol Chem*. 1999 Jul 2;274(27):18947-56.
  101. Lo Muzio L, Leonardi R, Mariggio MA, Mignogna MD, Rubini C, Vinella A, et al. HSP 27 as possible prognostic factor in patients with oral squamous cell carcinoma. *Histol Histopathol*. 2004 Jan;19(1):119-28.
  102. Iwaki T, Iwaki A, Tateishi J, Sakaki Y, Goldman JE. Alpha B-crystallin and 27-kd heat shock protein are regulated by stress conditions in the central nervous system and accumulate in Rosenthal fibers. *Am J Pathol*. 1993 Aug;143(2):487-95.
  103. Ebert MP, Schafer C, Chen J, Hoffmann J, Gu P, Kubisch C, et al. Protective role of heat shock protein 27 in gastric mucosal injury. *J Pathol*. 2005 Oct;207(2):177-84.
  104. Alford KA, Glennie S, Turrell BR, Rawlinson L, Saklatvala J, Dean JL. Heat shock protein 27 functions in inflammatory gene expression and transforming growth factor-beta-activated kinase-1 (TAK1)-mediated signaling. *J Biol Chem*. 2007 Mar 2;282(9):6232-41.
  105. Borrelli MJ, Bernock LJ, Landry J, Spitz DR, Weber LA, Hickey E, et al. Stress protection by a fluorescent Hsp27 chimera that is independent of nuclear translocation or multimeric dissociation. *Cell Stress Chaperones*. 2002 Jul;7(3):281-96.
  106. Wu BJ, Morimoto RI. Transcription of the human hsp70 gene is induced by serum stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Sep;82(18):6070-4.
  107. Udono H, Srivastava PK. Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J Exp Med*. 1993 Oct 1;178(4):1391-6.
  108. Rippmann F, Taylor WR, Rothbard JB, Green NM. A hypothetical model for the peptide binding domain of hsp70 based on the peptide binding domain of HLA. *EMBO J*. 1991 May;10(5):1053-9.
  109. Neckers L. Heat shock protein 90: the cancer chaperone. *J Biosci*. 2007 Apr;32(3):517-30.
  110. Born WK, O'Brien RL, Modlin RL. Antigen specificity of gamma delta T lymphocytes. *FASEB J*. 1991 Sep;5(12):2699-705.
  111. Doherty PC. The function of gamma delta T cells. *Br J Haematol*. 1992 Jul;81(3):321-4.
  112. Wadia P, Atre N, Pradhan T, Mistry R, Chiplunkar S. Heat shock protein induced TCR gammadelta gene rearrangements in patients with oral cancer. *Oral Oncol*. 2005 Feb;41(2):175-82.
  113. Benjamin IJ, McMillan DR. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 1998 Jul 27;83(2):117-32.
  114. Kaufmann SH. Heat shock proteins and the immune response. *Immunol Today*. 1990 Apr;11(4):129-36.
  115. Welch WJ. How cells respond to stress. *Sci Am*. 1993 May;268(5):56-64.
  116. Beissinger M, Buchner J. How chaperones fold proteins. *Biol Chem*. 1998 Mar;379(3):245-59.
  117. Ferns G, Shams S, Shafi S. Heat shock protein 27: its potential role in vascular disease. *Int J Exp Pathol*. 2006 Aug;87(4):253-74.
  118. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones*. 2005 Summer;10(2):86-103.



119. Vasques MT, Alves MA, de Cerqueira Luz JG, Correa L. Immunolocalization of heat shock proteins 27 and 47 during repair of induced oral ulcers. *J Oral Sci.* 2010;52(4):623-31.
120. Hirano S, Shelden EA, Gilmont RR. HSP27 regulates fibroblast adhesion, motility, and matrix contraction. *Cell Stress Chaperones.* 2004 Mar;9(1):29-37.
121. Leonardi R, Villari L, Caltabiano M, Travali S. Heat shock protein 27 expression in the epithelium of periapical lesions. *J Endod.* 2001 Feb;27(2):89-92.
122. Pons M, Cousins SW, Csaky KG, Striker G, Marin-Castano ME. Cigarette smoke-related hydroquinone induces filamentous actin reorganization and heat shock protein 27 phosphorylation through p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 in retinal pigment epithelium: implications for age-related macular degeneration. *Am J Pathol.* 2010 Sep;177(3):1198-213.
123. Dabbs D. Techniques of immunohistochemistry: principles, pitfalls and standarization. En: *Diagnostic immunohistochemistry.* Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2002.
124. Ravn V, Dabelsteen E. Tissue distribution of histo-blood group antigens. *APMIS.* 2000 Jan;108(1):1-28.
125. Kornum JB, Svaerke C, Thomsen RW, Lange P, Sorensen HT. Chronic obstructive pulmonary disease and cancer risk: A Danish nationwide cohort study. *Respir Med.* 2012 Jan 2.
126. Ujpal M, Matos O, Bibok G, Somogyi A, Szabo G, Suba Z. Diabetes and oral tumors in Hungary: epidemiological correlations. *Diabetes Care.* 2004 Mar;27(3):770-4.
127. Waldron CA, Shafer WG. Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study 3256 oral leukoplakias. *Cancer.* 1975 Oct;36(4):1386-92.
128. Gandour-Edwards R, Trock BJ, Gumerlock P, Donald PJ. Heat shock protein and p53 expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998 May;118(5):610-5.
129. Seoane JM, Varela-Centelles PI, Ramirez JR, Cameselle-Teijeiro J, Romero MA, Aguirre JM. Heat shock proteins (HSP70 and HSP27) as markers of epithelial dysplasia in oral leukoplakia. *Am J Dermatopathol.* 2006 Oct;28(5):417-22.
130. Lo Muzio L, Campisi G, Farina A, Rubini C, Ferrari F, Falaschini S, et al. Prognostic value of HSP27 in head and neck squamous cell carcinoma: a retrospective analysis of 57 tumours. *Anticancer Res.* 2006 Mar-Apr;26(2B):1343-9.
131. Mohtasham N, Babakoochi S, Montaser-Kouhsari L, Memar B, Salehinejad J, Rahpeyma A, et al. The expression of heat shock proteins 27 and 105 in squamous cell carcinoma of the tongue and relationship with clinicopathological index. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011 Sep;16(6):e730-5.
132. Faried A, Sohda M, Nakajima M, Miyazaki T, Kato H, Kuwano H. Expression of heat-shock protein Hsp60 correlated with the apoptotic index and patient prognosis in human oesophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 2004 Dec;40(18):2804-11.
133. Fan GK, Chen J, Ping F, Geng Y. Immunohistochemical analysis of P57(kip2), p53 and hsp60 expressions in premalignant and malignant oral tissues. *Oral Oncol.* 2006 Feb;42(2):147-53.
134. Le Pendu J, Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, Le Moullac-Vaidye B, Clement M. ABH and Lewis histo-blood group antigens in cancer. *APMIS.* 2001 Jan;109(1):9-31.
135. Lucas H, Bercegeay S, Le Pendu J, Jean M, Mirallie S, Barriere P. A fucose-containing epitope potentially involved in gamete interaction on the human zona pellucida. *Hum Reprod.* 1994 Aug;9(8):1532-8.

136. George DI, Hanks CT, Lopatin DE. The expression of the epithelial blood-group substances: normal and malignant tissues. *J Dent Res*. 1980 Nov;59(11):2014-20.
137. Gao S, Worm J, Guldberg P, Eiberg H, Krogdahl A, Liu CJ, et al. Genetic and epigenetic alterations of the blood group ABO gene in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2004 Mar 20;109(2):230-7.
138. Gao S, Bennett EP, Reibel J, Chen X, Christensen ME, Krogdahl A, et al. Histo-blood group ABO antigen in oral potentially malignant lesions and squamous cell carcinoma--genotypic and phenotypic characterization. *APMIS*. 2004 Jan;112(1):11-20.
139. Dabelsteen E. ABO blood group antigens in oral mucosa. What is new? *J Oral Pathol Med*. 2002 Feb;31(2):65-70.
140. Hakomori S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Aug 6;99(16):10231-3.
141. Dabelsteen E, Pindborg JJ. Loss of epithelial blood group substance A in oral carcinomas. *Acta Pathol Microbiol Scand A*. 1973 Jul;81(4):435-44.
142. Mandel U, Langkilde NC, Orntoft TF, Therkildsen MH, Karkov J, Reibel J, et al. Expression of histo-blood-group-A/B-gene-defined glycosyltransferases in normal and malignant epithelia: correlation with A/B-carbohydrate expression. *Int J Cancer*. 1992 Aug 19;52(1):7-12.
143. Kumamoto K, Goto Y, Sekikawa K, Takenoshita S, Ishida N, Kawakita M, et al. Increased expression of UDP-galactose transporter messenger RNA in human colon cancer tissues and its implication in synthesis of Thomsen-Friedenreich antigen and sialyl Lewis A/X determinants. *Cancer Res*. 2001 Jun 1;61(11):4620-7.
144. Etchison JR, Freeze HH. A new approach to mapping co-localization of multiple glycosyl transferases in functional Golgi preparations. *Glycobiology*. 1996 Mar;6(2):177-89.
145. Dabelsteen E, Graem N, Clausen H, Hakomori S. Structural variations of blood group A antigens in human normal colon and carcinomas. *Cancer Res*. 1988 Jan 1;48(1):181-7.
146. Alvarez-Fernandez E, Carretero-Albinana L. Expression of blood group antigens by normal bronchopulmonary tissues and common forms of pulmonary carcinomas. *Arch Pathol Lab Med*. 1991 Jan;115(1):42-9.
147. Hirohashi S, Ino Y, Kodama T, Shimosato Y. Distribution of blood group antigens A, B, H, and I(Ma) in mucus-producing adenocarcinoma of human lung. *J Natl Cancer Inst*. 1984 Jun;72(6):1299-305.
148. Lee JS, Ro JY, Sahin AA, Hong WK, Brown BW, Mountain CF, et al. Expression of blood-group antigen A--a favorable prognostic factor in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 1991 Apr 18;324(16):1084-90.
149. Sanchez-Mora N, Cebollero Presmanes M, Monroy V, Herranz Aladro M, Alvarez-Fernandez E. Expression of histo-blood group antigens in bronchial squamous metaplasia. *Eur Respir J*. 2007 Feb;29(2):268-72.
150. Ernst C, Thurin J, Atkinson B, Wurzel H, Herlyn M, Stromberg N, et al. Monoclonal antibody localization of A and B isoantigens in normal and malignant fixed human tissues. *Am J Pathol*. 1984 Dec;117(3):451-61.
151. Itzkowitz SH, Dahiya R, Byrd JC, Kim YS. Blood group antigen synthesis and degradation in normal and cancerous colonic tissues. *Gastroenterology*. 1990 Aug;99(2):431-42.
152. Itzkowitz SH, Yuan M, Ferrell LD, Ratcliffe RM, Chung YS, Satake K, et al. Cancer-associated alterations of blood group antigen expression in the human pancreas. *J Natl Cancer Inst*. 1987 Sep;79(3):425-34.

153. Perlman EJ, Epstein JI. Blood group antigen expression in dysplasia and adenocarcinoma of the prostate. *Am J Surg Pathol*. 1990 Sep;14(9):810-8.
154. Inai K, Yamamoto A, Arihiro K, Khatun N, Kurihara K, Takeda S. Epithelial hyperplasia of the breast. Comparison of incidence between cases of breast carcinoma and control autopsy specimens with immunohistochemical observation of blood group antigens. *Acta Pathol Jpn*. 1992 Mar;42(3):193-200.
155. Memon RS, Yonezawa S, Hasui K, Sato E. Expression of blood group antigens and lectin binding in adenocarcinomas of the endometrium. *Acta Pathol Jpn*. 1990 Jul;40(7):509-16.
156. Skovlund VR. ABH and related histo-blood group antigens in normal & malignant human endometrium in relation to genetic and hormonal factors. *APMIS Suppl*. 1997;69:1-33.
157. Metoki R, Kakudo K, Tsuji Y, Teng N, Clausen H, Hakomori S. Deletion of histo-blood group A and B antigens and expression of incompatible A antigen in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1989 Aug 2;81(15):1151-7.
158. Welshinger M, Finstad CL, Venkatraman E, Federici MG, Rubin SC, Lewis JL, Jr., et al. Expression of A, B, and H blood group antigens in epithelial ovarian cancer: relationship to tumor grade and patient survival. *Gynecol Oncol*. 1996 Jul;62(1):106-12.
159. Dabelsteen E, Roed-Petersen B, Pindborg JJ. Loss of epithelial blood group antigens A and B in oral premalignant lesions. *Acta Pathol Microbiol Scand A*. 1975 May;83(3):292-300.
160. Orlow I, Lacombe L, Pellicer I, Rabbani F, Delgado R, Zhang ZF, et al. Genotypic and phenotypic characterization of the histoblood group ABO(H) in primary bladder tumors. *Int J Cancer*. 1998 Mar 16;75(6):819-24.
161. Dabelsteen E, Fejerskov O. Loss of epithelial blood group antigen-A during wound healing in oral mucous membrane. *Acta Pathol Microbiol Scand A*. 1974 May;82(3):431-4.
162. Dabelsteen E, Gron B, Mandel U, Mackenzie I. Altered expression of epithelial cell surface glycoconjugates and intermediate filaments at the margins of mucosal wounds. *J Invest Dermatol*. 1998 Oct;111(4):592-7.
163. Menoret A, Otry C, Labarriere N, Breimer ME, Piller F, Meflah K, et al. The expression of carbohydrate blood group antigens correlates with heat resistance. *J Cell Sci*. 1995 Apr;108 ( Pt 4):1691-701.
164. Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T, Nakamura S, Hiraki A, Sasaki M, et al. Immunohistochemical study of sialyl Le(a) and sialyl Le(x) antigen in oral squamous cell carcinoma: the association of sialyl Le(a) expression with the metastatic potential. *Head Neck*. 1999 Jul;21(4):330-7.
165. Dabelsteen E, Clausen H, Holmstrup P, Reibel J. Premalignant and malignant oral lesions are associated with changes in the glycosylation pattern of carbohydrates related to ABH blood group antigens. *APMIS*. 1988 Sep;96(9):813-9.
166. Xie X, Boysen M, Clausen OP, Bryne MA. Prognostic value of Le(y) and H antigens in oral tongue carcinomas. *Laryngoscope*. 1999 Sep;109(9):1474-80.
167. Sakamoto J, Furukawa K, Cordon-Cardo C, Yin BW, Rettig WJ, Oettgen HF, et al. Expression of Lewis, Lewisb, X, and Y blood group antigens in human colonic tumors and normal tissue and in human tumor-derived cell lines. *Cancer Res*. 1986 Mar;46(3):1553-61.
168. Suzuki M, Inufusa H, Yamamoto S, Hamada T, Aga M, Ando O, et al. Le(y) glycolipid acts as a co-factor for tumor procoagulant activity. *Int J Cancer*. 1997 Dec 10;73(6):903-9.

169. Halloran MM, Carley WW, Polverini PJ, Haskell CJ, Phan S, Anderson BJ, et al. Ley/H: an endothelial-selective, cytokine-inducible, angiogenic mediator. *J Immunol*. 2000 May 1;164(9):4868-77.
170. Boubelik M, Floryk D, Bohata J, Draberova L, Macak J, Smid F, et al. Lex glycosphingolipids-mediated cell aggregation. *Glycobiology*. 1998 Feb;8(2):139-46.
171. Wang Y, Liu J, Lin B, Wang C, Li Q, Liu S, et al. Study on the Expression and Clinical Significances of Lewis y Antigen and Integrin alphav, beta3 in Epithelial Ovarian Tumors. *Int J Mol Sci*. 2011;12(6):3409-21.
172. Gao L, Yan L, Lin B, Gao J, Liang X, Wang Y, et al. Enhancive effects of Lewis y antigen on CD44-mediated adhesion and spreading of human ovarian cancer cell line RMG-I. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011;30:15.
173. Carey TE, Nair TS, Chern C, Liebert M, Grossman HB, Wolf GT, et al. Blood group antigens and integrins as biomarkers in head and neck cancer: is aberrant tyrosine phosphorylation the cause of altered alpha 6 beta 4 integrin expression? *J Cell Biochem Suppl*. 1993;17F:223-32.
174. Orntoft TF. Carbohydrate changes in bladder carcinomas. *APMIS Suppl*. 1992;27:181-7.
175. Matsumoto H, Muramatsu H, Shimotakahara T, Yanagi M, Nishijima H, Mitani N, et al. Correlation of expression of ABH blood group carbohydrate antigens with metastatic potential in human lung carcinomas. *Cancer*. 1993 Jul 1;72(1):75-81.
176. David L, Leitao D, Sobrinho-Simoes M, Bennett EP, White T, Mandel U, et al. Biosynthetic basis of incompatible histo-blood group A antigen expression: anti-A transferase antibodies reactive with gastric cancer tissue of type O individuals. *Cancer Res*. 1993 Nov 15;53(22):5494-500.
177. Hakkinen I. A-like blood group antigen in gastric cancer cells of patients in blood groups Q or B. *J Natl Cancer Inst*. 1970 May;44(5):1183-93.
178. Yokota M, Warner GA, Hakomori S. Blood group A-like glycolipid and a novel Forssman antigen in the hepatocarcinoma of a blood group O individual. *Cancer Res*. 1981 Oct;41(10):4185-90.
179. Kaur J, Ralhan R. Differential expression of 70-kDa heat shock-protein in human oral tumorigenesis. *Int J Cancer*. 1995 Dec 11;63(6):774-9.
180. Suzuki H, Sugimura H, Hashimoto K. Overexpression of heat shock protein 27 is associated with good prognosis in the patient with oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2007 Mar;45(2):123-9.
181. Leonardi R, Pannone G, Magro G, Kudo Y, Takata T, Lo Muzio L. Differential expression of heat shock protein 27 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2002 Mar-Apr;9(2):261-6.
182. Ito T, Kawabe R, Kurasono Y, Hara M, Kitamura H, Fujita K, et al. Expression of heat shock proteins in squamous cell carcinoma of the tongue: an immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med*. 1998 Jan;27(1):18-22.
183. Kawanishi K, Shiozaki H, Doki Y, Sakita I, Inoue M, Yano M, et al. Prognostic significance of heat shock proteins 27 and 70 in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer*. 1999 Apr 15;85(8):1649-57.
184. Mese H, Sasaki A, Nakayama S, Yoshioka N, Yoshihama Y, Kishimoto K, et al. Prognostic significance of heat shock protein 27 (HSP27) in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2002 Mar-Apr;9(2):341-4.
185. Soldes OS, Kuick RD, Thompson IA, 2nd, Hughes SJ, Orringer MB, Iannettoni MD, et al. Differential expression of Hsp27 in normal oesophagus, Barrett's metaplasia and oesophageal adenocarcinomas. *Br J Cancer*. 1999 Feb;79(3-4):595-603.

186. Zhu Z, Xu X, Yu Y, Graham M, Prince ME, Carey TE, et al. Silencing heat shock protein 27 decreases metastatic behavior of human head and neck squamous cell cancer cells in vitro. *Mol Pharm*. 2010 Aug 2;7(4):1283-90.
187. Fortin A, Raybaud-Diogene H, Tetu B, Huot J, Blondeau L, Landry J. Markers of neck failure in oral cavity and oropharyngeal carcinomas treated with radiotherapy. *Head Neck*. 2001 Feb;23(2):87-93.
188. Yonekura N, Yokota S, Yonekura K, Dehari H, Arata S, Kohama G, et al. Interferon-gamma downregulates Hsp27 expression and suppresses the negative regulation of cell death in oral squamous cell carcinoma lines. *Cell Death Differ*. 2003 Mar;10(3):313-22.
189. Samali A, Cai J, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *EMBO J*. 1999 Apr 15;18(8):2040-8.
190. Xanthoudakis S, Roy S, Rasper D, Hennessey T, Aubin Y, Cassady R, et al. Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis. *EMBO J*. 1999 Apr 15;18(8):2049-56.
191. Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, Kumar V, et al. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J*. 2000 Aug 15;19(16):4310-22.
192. Lee SS, Tsai CH, Ho YC, Chang YC. The upregulation of heat shock protein 70 expression in areca quid chewing-associated oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2008 Sep;44(9):884-90.
193. Kaur J, Srivastava A, Ralhan R. Expression of 70-kDa heat shock protein in oral lesions: marker of biological stress or pathogenicity. *Oral Oncol*. 1998 Nov;34(6):496-501.
194. Sugerman PB, Savage NW, Xu LJ, Walsh LJ, Seymour GJ. Heat shock protein expression in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1995 Jan;31B(1):63-7.
195. Seoane J, Ramirez JR, Romero MA, Varela-Centelles P, Garcia-Pola MJ. Expression of heat shock protein (HSP70) in oral lichen planus and non-dysplastic oral leucoplakia. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 2004 Apr;29(2):191-6.
196. Thubashini M, Malathi N, Kannan L. Expression of heat shock protein70 in oral submucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *Indian J Dent Res*. 2011 Mar-Apr;22(2):256-9.
197. Kaur J, Srivastava A, Ralhan R. p53-HSP70 complexes in oral dysplasia and cancer: potential prognostic implications. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1996 Jan;32B(1):45-9.
198. Kaur J, Srivastava A, Ralhan R. Serum p53 antibodies in patients with oral lesions: correlation with p53/HSP70 complexes. *Int J Cancer*. 1997 Dec 19;74(6):609-13.
199. Kaur J, Das SN, Srivastava A, Ralhan R. Cell surface expression of 70 kDa heat shock protein in human oral dysplasia and squamous cell carcinoma: correlation with clinicopathological features. *Oral Oncol*. 1998 Mar;34(2):93-8.
200. Kaur J, Ralhan R. Induction of apoptosis by abrogation of HSP70 expression in human oral cancer cells. *Int J Cancer*. 2000 Jan 1;85(1):1-5.
201. King TA, Ghazaleh RA, Juhn SK, Adams GL, Ondrey FG. Induction of heat shock protein 70 inhibits NF-kappa-B in squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005 Jul;133(1):70-9.

202. Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol.* 1988 Feb;8(2):531-9.
203. Twomey BM, McCallum S, Isenberg DA, Latchman DS. Elevation of heat shock protein synthesis and hsp gene transcription during monocyte to macrophage differentiation of U937 cells. *Clin Exp Immunol.* 1993 Aug;93(2):178-83.
204. Thiel UJ, Feltens R, Adryan B, Gieringer R, Brochhausen C, Schuon R, et al. Analysis of differentially expressed proteins in oral squamous cell carcinoma by MALDI-TOF MS. *J Oral Pathol Med.* 2011 May;40(5):369-79.
205. Tavassol F, Starke OF, Kokemuller H, Wegener G, Muller-Tavassol CC, Gellrich NC, et al. Prognostic significance of heat shock protein 70 (HSP70) in patients with oral cancer. *Head Neck Oncol.* 2011;3:10.

## **VII. ANEXO**

### **1. Informe del comité ético**

### **2. Modelo de consentimiento informado**

**3. Artículo 1:** Garcia-Garcia V, Bascones Martinez A, Martinelli-Klay CP, Alvarez Fernandez E, Lombardi T and Kuffer R. New perspectives on the dynamic behaviour of oral lichen planus. 2012, *Eur J Dermatol* (in press).

**4. Artículo 2:** Garcia-Garcia V, Bascones Martinez A, Ana I. García-Kass, Martinelli-Klay CP, Alvarez Fernandez E, Lombardi T and Kuffer R. Analysis of the expression of heat-shock protein 27 in patients with oral lichen planus.

### INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

D<sup>a</sup> **M. García Arenillas**, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid,

**HACE CONSTAR:**

Que este Comité ha evaluado el proyecto de investigación titulado **(B-06/040) “ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO Y ANTÍGENOS DE GRUPO SANGUÍNEO ABO Y LEWIS EN CARCINOMAS Y LESIONES PRECANCERIZABLES DE LA MUCOSA BUCAL”**

Y considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.

La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Es adecuado el procedimiento previsto para obtener el consentimiento informado de los sujetos para participar en el estudio.

El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

Y que este Comité **informa favorablemente** sobre la realización de dicho proyecto en el Departamento de Psicología diferencial y del Trabajo (Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid), por el **Dr. Antonio Bascones Martínez** como investigador principal.

Lo que firmo en Madrid, a 9 de marzo de 2006.

  
Fdo. Dra. M. García Arenillas



## CONSENTIMIENTO INFORMADO

☞ Como participante de este estudio, he sido informado acerca de los propósitos de los exámenes que se piensan realizar con las muestras de la mucosa que se me tomarán de la boca.

☞ Entiendo que después de colocar la anestesia local para proceder al tratamiento quirúrgico que necesito se me tomará una biopsia para obtener un pequeño fragmento de la mucosa del tamaño de una lenteja ( 4 milímetros) que constituye un excedente de tejido durante la intervención.

☞ Entiendo que a continuación, se dará un punto en los sitios de la biopsia, que será retirado siete días después para garantizar su correcta cicatrización.

☞ De vez en cuando, y no en todas las personas, pueden presentarse, además de un ligero ardor al colocar la anestesia, la formación de un pequeño hematoma o colección de sangre que desaparecerá espontáneamente en menos de una semana, o una leve infección que será controlada con antibióticos si el caso lo requiere.

☞ No tengo obligación alguna de mi parte con quienes realizan este estudio y puedo retirarme en el momento que yo desee o juzgue conveniente. Esto no será motivo para que no se me atienda debidamente en el futuro si solicito los servicios de atención médica.

☞ También deseo que la información que se obtenga de este estudio sea confidencial y no se divulguen los resultados en sitios diferentes de una publicación científica o a las autoridades de salud

☞ Entiendo que puedo realizar todas las preguntas que considere necesarias.

☞ He recibido suficiente información sobre el estudio

Conforme con todo lo anteriormente expuesto, presto de forma voluntaria mi conformidad para participar en este estudio.

Firma del paciente.

Fdo.:.....

Lugar y fecha.....

